

健康に良い還元水研究の 進歩

白畑實隆*

濱崎武記

照屋輝一郎

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門〒8
12-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
(電話 : +81-92-642-3045; ファックス :
+81-92-642-3052;

電子メール: sirahata@grt.kyushu-u.ac.jp)

*責任著者

日本では機能水、なかでも還元水に関する研究が急速なペースで進展している。電解還元水や天然還元水などの還元水は培養細胞中の活性酸素種を消去することができる。還元水は酸化ストレス疾患、例えば糖尿病、ガン、動脈硬化症、神経変性疾患や血液透析の副作用に対して予防および改善効果が期待されている。還元水中の活性物質は水素（原子及び分子）、ミネラルナノ粒子及びミネラル水素化物であることが示唆されている。

序論：還元水は健康に有益な水である

食品科学工学の分野では、健康に良い効果を及ぼす機能性食品に関する研究が現在盛んに行われている。一方、水は味覚、レオロジーや食品の保存に影響を及ぼす重要な成分の一つである。しかし、飲料水にも生理学的機能があり、健康に良い効果をもつ水があることはまだよく知られていない (Shirahata, 2002; 2004)。ここ 10 年で、長年にわたる地球規模の環境汚染のために水道水の質が低下していることが大きな社会問題になってきた。大気汚染は酸性

雨を引き起こし、土壌や河川の水および農作物に影響を及ぼしている。汚染された水の中の化学物質は、妊婦の胎盤において酸化ストレスを発生させると考えられており、新生児にさまざまな疾患を引き起こす可能性が指摘されている (Obolenskaya *et al.*, 2010)。

人体の約 60-80%は水で占められている。体内の水の機能は大きく 3 つに大別される。(1) 水分子そのものの機能。流れる水は細胞機能と器官の発生及び機能の両方に影響を及ぼす。心臓の形や体の左右の形の決定に体液や血液の流れが重要な役割を果たしている (Hirokawa, Tanaka, Okada, & Takeda, 2006; Hove *et al.*, 2003)。また、水の水和及びブラウン運動はタンパク質機能にとって根本的に重要である。ミオシンタンパク質が水のブラウン運動を利用して動くことによって筋肉は少ないエネルギーで収縮することができる (Iwaki *et al.*, 2009)。(2) 水分子に由来する原子と分子による機能。例えば、水素イオン(陽子、プロトン、 H^+)、水素原子(活性水素、原子状水素、水素ラジカル、 $H\cdot$)、水素アニオン(マイナス水素イオン、 H^-)、水素分子(H_2)、酸素原子(活性酸素、原子状酸素、酸素ラジカル、 $O\cdot$)、及び活性酸素種(reactive oxygen species, ROS: 一重項酸素、スーパーオキシドラジカル、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、過酸化脂質、一酸化窒素、次亜塩素酸、オゾンなど)、酸素分子(O_2)などによる機能。(3) 水に溶解した分子による機能。例えば、ミネラルイオン、ミネラルナノ粒子、有機および無機化合物及び溶存ガスなどによる機能。

(1) から (3) までの解明されつつある機能に加えて、今後注目されると思われる機能は会合状態の水の機能である。水は弱い水素結合

によって相互に結合してネットワークを作っている。このネットワークのために、水は生き物のような非線形の挙動を示す。また、正または負に荷電したゲルまたは溶質の回りには数百万層の水が強固なクラスター構造を作り、数百 μm にわたって溶質の侵入を拒否する液晶状態の水を作り出すことが知られている (Zheng & Pollack, 2003)。液晶物質はテレビモニターなどに利用されているように、情報伝達能力に優れている。生体内には多数の荷電物質が存在するために、生体内には液晶状態の水が多く存在すると推測される。今後、水のクラスター構造や液晶構造と生体機能との関係を解明していく必要があると考えられる。

機能水とは特定の機能を示す活性化された水であると定義される。電気分解、磁場による処理、光照射、超音波処理、ガスによる通気、強い水流と衝突、ある種のミネラルまたは岩石による処理といった様々な水の活性化方法がある。機能水とは人工的に処理された水の中で、治療と機能の両面において科学的に証明されたあるいはされようとしている水、または再現性があり有益な機能が証明されたあるいはされようとしている水であるというように、日本機能水学会では定義されている。一方、当研究室では天然水の中にも天然還元水のような優れた機能を持った水が存在することを見出しており、これらの水も機能水に含まれると考えている。機能水の中では、電解水が最も良く研究されている。電気化学的に還元された水 (electrochemically reduced water, ERW、電解還元水) は陰極付近で作られ、電気化学的に酸化された水 (electrochemically oxidized water, EOW、電解酸化水) は陽極の近くで作られる。本論文で論じるように、飲用可能な電解還元水は健康に有益な水である。電解酸化水は電解酸性水とも呼称されており、主に次亜

塩素酸、塩素ガスやオゾンの作用により殺菌作用を示す機能水である (Bari, Sabina, Isobe, Uemura, & Isshiki, 2003) (図 1A)。

飲用可能な電解還元水 (pH 8-10) は、健康に有益な水として日本では広く普及している。電解還元水は、物理化学的および生理学的観点から、アルカリ性電解水、アルカリイオン水、アルカリ性陰極水あるいはアルカリ性イオン水とも呼ばれている。本論文では生理機能を重視した電解還元水という呼称を主として使用している。電解還元水はアルカリ性の pH を示し、水素分子が豊富に含まれ、マイナスの酸化還元電位 (oxidation-reduction potential, ORP) を示し、活性酸素種除去活性をもっている (Shirahata *et al.*, 2007)。電解還元水の機能に関する研究は日本では 1931 年に始まり、農業への応用は 1954 年に最初に試みられた。1960 年には、健康に有益な水として医療に利用され、1966 年に日本の厚生労働省は医薬品と同様に、電解還元水が慢性下痢症、消化不良、胃腸内異常発酵、制酸及び胃酸過多に有効であるという効能を謳うことを認め、家庭用医療機器として電解還元水生成装置の使用を許可した (アルカリ・イオン整水器協議会のホームページを参照: [http:// www.3aaa.gr.jp/english/alkali/kl.html](http://www.3aaa.gr.jp/english/alkali/kl.html))。1994 年には電解水の社会での利用を促進することを主目的として、(財)機能水研究振興財団が厚生労働省の支援で設立された。Hayakawa (1999) は、8 週間アルカリイオン水を投与したラットの虫垂では、対照のラットに比べて有意に低い全短鎖脂肪酸量を示すことを報告した。しかし、アルカリイオン水は腸内細菌のフローラには影響を及ぼさなかった。pH 10 の電解還元水を投与したラットは腸において対照のラットに比べて、より低い ORP を維持していた。アルカリイオン水の効果に関する無作為二重盲検臨床試験が、腹

部症状(例えば胸焼け、身体違和感、腹部膨満、慢性下痢症と便秘など)を有する被験者を対象に1996年1月から1999年1月まで実施された。心理的な効果ではないことを示すためのプラセボ対照水として水道水を活性炭フィルタに通して得られる浄水を用い、その浄水を電気分解することにより得られたアルカリオン水を試験水とした。被験者数は、アルカリオン水群の84人と浄水群の79人であった。被験者は2週間の間、1日当たり少なくとも0.5LのpH 9.5のアルカリオン水または浄水を飲んだ。その結果、アルカリオン水が浄水に

比べて有意に腹部症状を改善することが明らかとなった。特に、アルカリオン水を飲んだ慢性下痢症の患者は、浄水を飲んだ患者の結果(64.7%)と比較して、94.1%という有意に高い改善効果を示した(Tashiro et al., 2000)。日本の薬事法が2005年に改訂されたとき、多くの科学的な証拠に基づいて、電解還元水作製装置は家庭用医療器具として再認可された。機器使用の目的は胃腸症状の改善のために飲用アルカリ電解水を作製することにあるとされた。日本機能水学会が2001年に設立され、電解還元水を含む様々な機能水に関する活発な研究

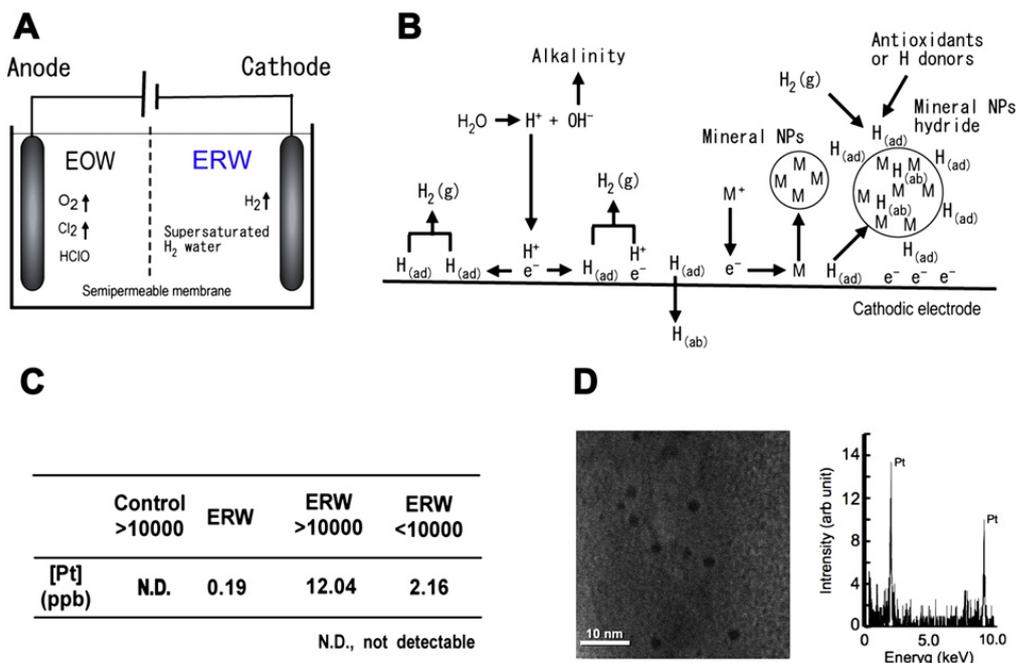


図1. 電解還元水、ミネラルナノ粒子及びミネラル水素化物の電気化学的作成。A. 電気分解水調製の原理。陰極近くの電解還元水は水素分子を豊富に含む水である。陽極近くの電解酸化水は、酸素ガス、塩素ガス、及び原水が塩素イオンを含む場合は次亜塩素酸を含んでいる。B. 白金電極表面における化学反応。水から解離する水素イオンは電子と結合することで還元されて白金電極表面に吸着されたH原子(H_{ad})になる。H_{ad}は白金板表面を移動(overflow、溢流)して、H₂に変化する。一部のH_{ad}はPt金属内に吸収され、吸蔵水素(H_{ab})となる。原水中に存在するミネラルイオンは、金属原子に還元されて、自己組織化によりミネラルナノ粒子になる。有機保護材で保護されたミネラルナノ粒子は安定で、長期間(数年間程度)水の中で分散している。ミネラルナノ粒子は水素分子または有機抗酸化剤などの水素供与体の存在下で水素原子を吸着・吸蔵する。C. 電解還元水(ERW)は微量の白金(Pt)ナノ粒子を含む。Ye et al. (2008)によって報告されているように、電解還元水は2mMのNaOH溶液を100Vの直流で1時間電気分解して作製された。電解還元水は分離限界粒径10,000の限外ろ過膜でろ過された。分子量10,000ダルトン以上と10,000ダルトン未満の画分の白金含有量をICP-MSで測定した。コントロールは電気分解前の2mMのNaOH溶液である。D. 左の写真は電解還元水の画分(分子量10,000ダルトン以上)の透過型電子顕微鏡の写真(5,000倍)を示す。右の図は左の写真のエネルギー分散型X線分光計分析図であり、ナノ粒子が白金のみからなっていることを示す。

が現在まで行われてきている。

新しい活性酸素消去剤としての水素及びミネラルナノ粒子を含む還元水の作用機序

多くの臨床データから電解還元水が様々な酸素ストレス関連疾患を改善することが示唆されている (Hayashi & Kawamura, 2002)。また、日本の日田市の地下水 (日田天領水という商標で市販) とドイツのノルデナウ水などの天然還元水も活性酸素除去活性を示した (Li *et al.*, 2002)。著者らは、インビトロ試験で電解還元水が活性酸素種を消去し、活性酸素種によって誘発される DNA 損傷を抑制することを報告した (Shirahata *et al.*, 1997)。水の電気分解の時には、加電圧のほとんどが陰極表面付近の非常に薄い水層にかかり、非常に強い電場を形成するために、すべてのイオンは加速度的に移動し、高い反応性を持つ。陰極付近の水自身も強い還元的雰囲気の中で高いエネルギー状態をなっていると推測される。陰極の白金電極表面は水中の水素イオンが電子を受け取ることで生成する水素原子 (活性水素) でびっしりと覆われた状態となる。白金表面では水素原子は自由に移動できる。これを水素原子の溢流 (overflow) と呼ぶ。移動した水素原子が出会うと水素分子となってガス化する。水素分子の飽和濃度は室温では 1.6 ppm 程度であるが、作製直後の電解還元水には過飽和の水素分子が含まれており、一部は水素ナノバブルとなっている。酸素やオゾンナノバブルは大変安定で半年ほど高濃度状態を維持できるが、水素ナノバブルは解放条件では 3 時間ほどで消失する (補足情報参照)。水素はエネルギー物質であるため、水素分子を高濃度で含む電解還元水は還元力を持ったエネルギー水であると見られることもできる。一方、吸着された水素原子の一部は白金内に取り込まれて吸蔵水素原子となる。金属

原子間に吸蔵された水素は一般に原子状水素の状態であるとされているが、金属内に存在する自由電子と結合したマイナス水素イオンの状態であるとも見なすことができ、その区別は明確ではない。水素は最も小さな原子であり、ほとんど全ての金属に吸着・吸蔵される。水素の吸蔵は原子間距離を拡大させ、金属疲弊の原因となる。吸蔵された水素原子は金属表面に拡散・移動し、金属表面に出てきた水素原子は還元力を示す。また、水素原子同士が結合して水素分子 (ガス) を発生させる。したがって、水素吸蔵金属は有機抗酸化物質と同様に、水素原子供与能を持つ還元物質であるとも見なすことができる。

市販されている電解還元水作製装置には、しばしばチタン表面を白金で電気メッキした電極が使われている。白金は食品添加物として許可されている安全な金属であり、優れた水素発生能力を持っている。水道水や天然水中にはカルシウムイオンやマグネシウムイオンなどの様々なミネラルイオンが含まれている。これらのミネラルイオンは陰極表面で電子を受けており、ミネラル原子となる。ミネラル原子は自己組織化してミネラルナノ粒子を形成する性質を持っている。数 nm 程度の微細なナノ粒子は沈殿せず、条件によっては数年以上安定に水の中に分散して存在することができる。数 nm 程度のナノ粒子は強い反応性を持っている表面原子を高い割合で保持しており、強い触媒活性を示す。また、トンネル効果などの特異な量子効果を示すため、工業製品、医薬品、化粧品、食品など多彩な分野への応用が盛んに研究されている。電解還元水中には原水中に含まれる様々なミネラルイオンから生成するミネラルナノ粒子及びミネラルナノ粒子水素化物が含まれると推測される (図 1 B)。イオン化傾向の低い白金、金、バナジウム、パラジウムなど

の金属ナノ粒子は比較的長期間存在すると考えられるが、徐々に電子を放出してもとのイオンに戻ると推測される。最近ではイオン化傾向の高いマグネシウムやカルシウムイオンも強い還元により安定な水素化物である MgH_2 や CaH_2 を生成することが知られている。ミネラル水素化粒子は吸蔵された水素も放出するため、より多くの電子や水素を放出することができる。実際、 MgH_2 や CaH_2 などの水素化物は水中で徐々に水素を放出するエネルギー物質として水素燃料電池や抗酸化食品への応用が進んでいる（補足情報参照）。水道水や天然水中には様々なミネラルイオン、有機化合物や無機化合物が含まれているため、それらの水を用いた電解還元水の作用機構を解明するのは容易ではないと考えられたため、我々は電解還

元水のモデル水として、水道水と同程度の電気伝導度を持つ $NaOH$ 溶液を用いて作製した電解還元水の化学的及び生物学的機能を解析してきた。図 1C 及び D に示すように、 $NaOH$ 溶液由来電解還元水を減圧濃縮器で濃縮した後、分子量 1 万カットの限外ろ過膜で分画したところ、非透過画分に 1 nm から 10 nm のサイズの白金ナノ粒子が含まれることを見出した（図 1C と D。補足情報参照）。原水には白金イオンはほとんど含まれていなかったため、これらの白金ナノ粒子は白金電極から溶出されたものと推測された。電解還元水モデル水では微量の白金ナノ粒子の触媒作用により水素分子から定常的に活性水素が発生することが推測された。そこで、白金酸イオンから様々なサイズの白金ナノ粒子を合成し、水素分子と

多機能活性酸素種除去剤としての白金ナノ粒子

2 次反応速度定数の比較

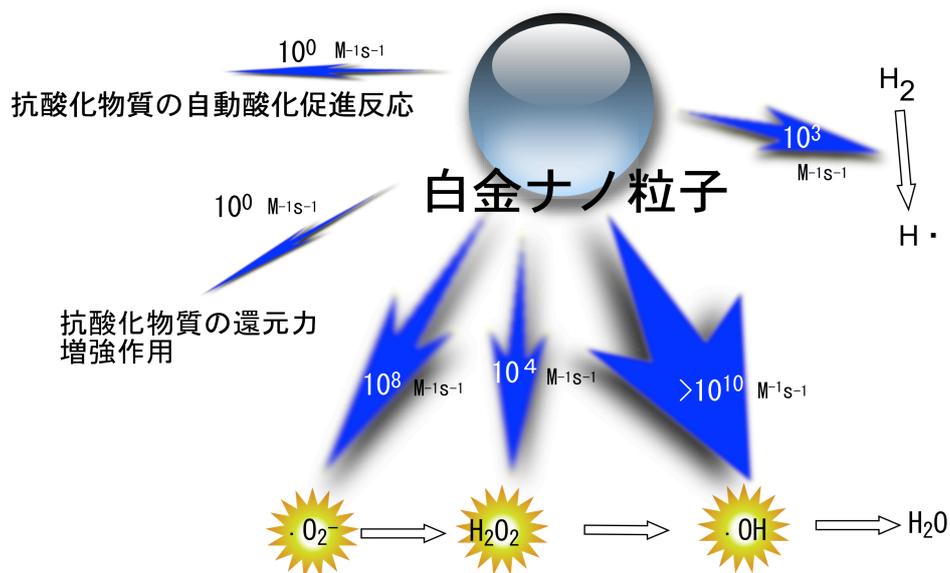


図 2. 白金ナノ粒子の多機能活性酸素除去活性。2~3 ナノメートルの合成白金ナノ粒子の二次反応速度は Hamasaki et al. (2008) によって報告されているように決定された。白金ナノ粒子は SOD 酵素のようなスーパーオキシドアニオンラジカル除去活性を示す。また、カタラーゼ様活性も示す。白金ナノ粒子のヒドロオキシラジカル除去活性は最も強力な除去剤であるアスコルビン酸などと同程度に強い。白金ナノ粒子は水素分子を活性水素に活性化するほか、抗酸化剤の還元力を増強する。白金ナノ粒子の抗酸化剤に対する自動酸化活性は弱い。数値は、二次反応速度定数の K_s 値を示す。

白金ナノ粒子が共存する場合に定常的に活性水素が生成することを証明した。また、合成した白金ナノ粒子の活性酸素種消去作用を反応速度論的に調べたところ、合成白金ナノ粒子はSOD酵素と同程度の効率でスーパーオキシドラジカル ($O_2\cdot^-$) を消去することを見出した。また、最も危険なヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) は最も強いアスコルビン酸 (ビタミンC) やグルタチオンなどと同程度かそれ以上の効率で消去することができた。さらに、カタラーゼよりは触媒効率が落ちるものの過酸化水素 (H_2O_2) も消去することができた (Kajita *et al.*, 2007 ; Hamasaki *et al.*, 2008) (図 2)。白金ナノ粒子は一つの物質で、SOD 様活性、カタラーゼ様活性、ヒドロキシルラジカル消去活性

を持つ多機能抗酸化物質であることが明らかとなり、酵素と異なり安定であるため、微量でも生理活性を示すものと推測された。実際、2 ppb という電解還元水モデル水に含まれる程度の微量の合成白金ナノ粒子が線虫の寿命を延長させることを見出した (Yan *et al.*, 2011)。

一方、多くの天然温泉水は還元系の水であるが、湧出後時間が経つと水は老化し、より酸化系の水に変化していく (補足情報参照)。最近の惑星形成理論によれば、地球の水の起源は星雲由来であり、原始地球では深さ 200km にも及ぶ大量の水を含んだ原始マグマ海洋に覆われていたと推測されている。創成の頃に存在していたと推測されている全地球を覆うほどの大量の水のほとんどが現在は存在していない。こ

活性水素ミネラルナノ粒子還元水説

還元水中の活性物質候補：活性水素 ($H\cdot$)、マイナス水素イオン (H^-)、水素分子 (ガス)、ミネラルナノ粒子、ミネラル水素化物 (CaH_2 , MgH_2 など)

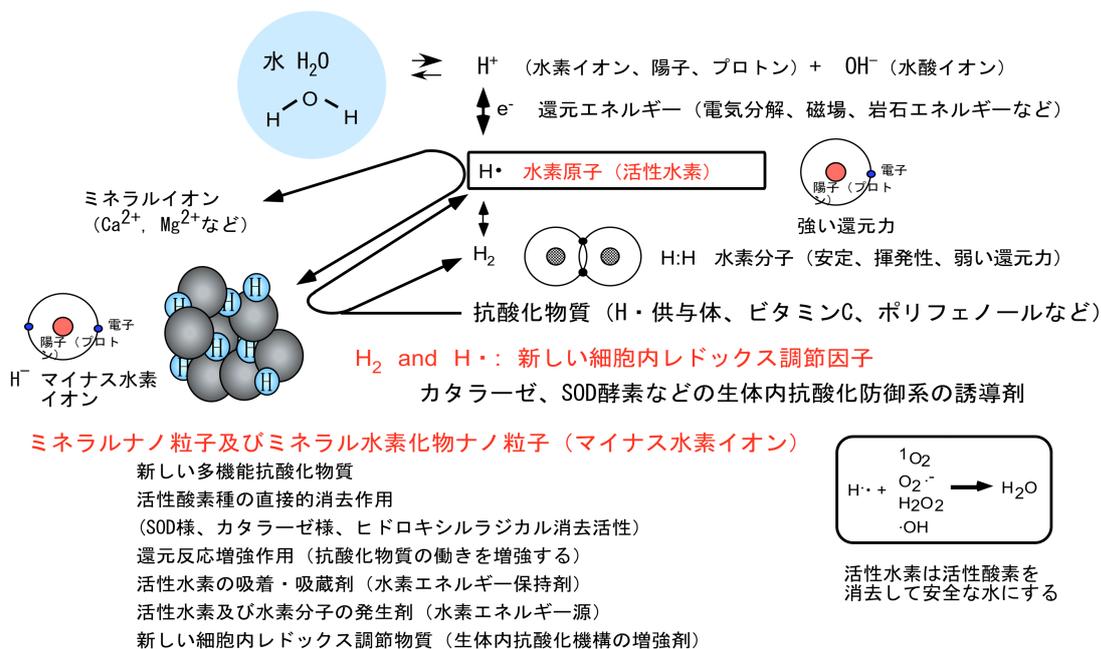


図 3. 活性水素ミネラルナノ粒子還元水説。電解還元水と天然還元水の一般的な作用機序として、水は電気エネルギー、岩石エネルギー又は他のエネルギーによって還元され、活性水素 (水素原子) とミネラルナノ粒子を産生する。水素原子は水素供与体として機能することができる弱い還元物質である水素分子 (エネルギー貯蔵分子の一つ) を産生する。一方、還元エネルギーを保持したミネラルナノ粒子は電子を放出しながら徐々にミネラルイオンに解離していく。ミネラルナノ粒子は触媒作用によって直接 $O_2\cdot^-$ 、 $\cdot OH$ 及び H_2O_2 を消去する。ミネラルナノ粒子は抗酸化剤やメタノールのような有機物質からの水素原子の放出を促進して還元性(力)を強化する。ミネラルナノ粒子水素化物は還元剤として機能できるマイナス水素イオンを放出することができる。

これは原始海洋の水が高熱のために水素と酸素に分解され、酸素が宇宙空間に散逸して失われたのに対し、水素は鉄と結合して鉄水素化物として地球の核に沈んでいったためであると考えられている(Sakamaki et al., 2009)。地球の核には 10%ほどの酸素以外の軽い元素が存在しており、これは原始地球が還元的雰囲気であったためと推定されている(Huang et al., 2011)。人間活動の活発化のために地球表面では酸化状態が強まっているが、地球全体で見れば、地球深部は酸素欠乏状態であり現在でも圧倒的な還元状態が維持されていると見なすことができる。最近の研究で、地下 5000m の深部地下でも数 m の地下と同程度の数の微生物が棲息していることが発見された。地下には光は届かず、また酸素も少ないため、地下の生物がどのようにしてエネルギーを得て生きているのか謎であった。1995 年に米国コロンビア川流域の地下 2000m からくみ出される地下水に約 $60 \mu\text{M}$ の水素ガスが含まれることが報告された。この水素ガスは地下の玄武岩により地下水が還元されて発生したものと推測され、地下の微生物が水素エネルギーを利用して生存している可能性が示唆された(Stevens et al., 1995)。その後の研究により、地下の微生物は水素を化学的に酸化することで呼吸をしていることが明らかとなり、大本のエネルギーは地球そのもの、すなわち岩石のエネルギーに由来することから岩石栄養生物と名付けられ、地下が地球最大の生命圏であることが明らかにされた(補足情報参照)。従来、生命体は太陽の光を利用する光合成植物などの独立栄養生物と独立栄養生物を食べて生存する従属栄養生物に大別されていたが、無機物と水をエネルギー源とする新たな生命体が発見されたことになる。地下 5000m では温度は 100°C を超えており、そこで棲息する微生物は地球で最初に発

生した生命体である可能性も考えられており、生命の起源に関する研究の対象ともなっている。日田天領水やノルデナウ水のような天然還元水は地下の水素のエネルギーを還元性ミネラルやミネラル水素化物のような形で保持した水である可能性が考えられる(補足情報参照)。天然還元水の中には水素分子を含む水もあると推定され、電解還元水と類似の機構で還元力を示すものと推測される。

一方、従来、弱い還元力が弱いために生体内の還元物質としてはほとんど注目されていなかった水素分子がヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライトなどの激しい反応性を持つ活性酸素種を特異的に消去し、脳梗塞モデルラットの症状を改善するという報告がなされた(Ohsawa et al., 2007)。その後、多くの酸化ストレス関連疾患モデル動物の症状改善に水素分子が有効であることが報告され、ヒトでの臨床試験も開始されている(補足情報参照)。当研究室でも水素分子が SOD 酵素やカタラーゼなどの抗酸化酵素を誘導して細胞内過酸化水素レベルを低下させることを報告した(Shirahata et al., 2011)。水素分子は腸内や口腔に存在する水素細菌により大量に生産されており、血中では酸素、炭酸ガスについて高い濃度を示すが、その生理機能はこれまでほとんど知られていなかった。今後の研究により、水素分子及び活性水素が一酸化窒素と同様に生体内レドックス制御を担う重要な因子であることが明らかにされるものと期待される。

我々は電解還元水と天然還元水の作用機序を統一的に説明するために、活性水素ミネラルナノ粒子還元水説を提唱した(図 3)(補足情報参照)。

電解還元水は無害な量のミネラルイオンを含む水を電気エネルギーによりミネラルナノ粒子に変換した水であると考えることができ

る。電解還元水中のミネラルナノ粒子は水素分子を活性水素に変換する働きを持ち、自身も多機能活性酸素消去剤として働くほか、還元エネルギーを徐々に徐々に放出して元の無害な水に戻ると考えられる。このことが電解還元水の飲用による副作用の報告が皆無であることと関係しているものと推測される。一方、天然還元水は地球そのものの還元エネルギーを保持した水であると考えられる。天然還元水の作用機構にはまだ不明な点が多く、電解還元水と同様にさらなる研究が望まれる。

還元水の抗糖尿病効果

2007年の国家健康栄養調査によれば、日本では、2210万人（全人口の6分の1に達する）が、糖尿病患者または糖尿病が疑われる人々である。真性糖尿病は、主に2つの型に分類される：1型インスリン依存型糖尿病と2型インスリン非依存性糖尿病である。1型糖尿病は、免疫細胞によって攻撃される膵臓β細胞の酸化損傷によるインスリン欠乏に起因する。2型糖尿病は、ストレス、過食や運動不足による筋肉および脂肪細胞の酸化損傷と強く関係している。電解還元水、日田天領水及びノルデナウ水はハムスター膵臓β細胞由来 HIT-T15細胞において細胞内活性酸素を除去し、インスリンの分泌を著しく促進することが示されている。アロキササン（1型糖尿病誘導剤）によって誘発される酸化損傷は、培養細胞モデルおよびアロキササン誘発性1型糖尿病モデルマウスにおいて抑制された（Li *et al.*, 2002, 2005, 2010, 2011）。電解還元水、日田天領水及びノルデナウ水はラット L6 筋管細胞において活性酸素を除去し、糖取り込みを増強した（Oda *et al.*, 1999）。電解還元水、ノルデナウ水及び日田天領水は、チロシンプロテインホスファターゼ（レドックス感受性タンパク質の1つ）の活性の抑制を介し

て、インスリン受容体のリン酸化を促進し、PI3 キナーゼと Akt を活性化し、糖輸送体 GLUT4 の細胞膜への移動（トランスロケーション）を促進することにより糖取込を促進する（Shirahata *et al.*, 2001, 2007）。これらの水は2型糖尿病モデルマウスにおいて耐糖能障害を軽減する（Gadek & Shirahata, 2002; Osada *et al.*, 2010）。水道水由来の電解還元水は糖尿病モデルマウスの症状を改善する（Jin *et al.*, 2006; Kim & Kim, 2006; Kim *et al.*, 2007）。

1日当たり2リットルのノルデナウ水を飲んだ411症例の2型糖尿病患者（平均年齢、71.5才）の45%において、血糖とHbA1cレベルは6日間の飲用後有意に低下した。これらのレベルはより長い期間にわたる飲用の後には更に低下した。また、血中コレステロール、低比重リポ蛋白（LDL）とクレアチニン濃度も有意に低下した。そして、高密度リポ蛋白質（HDL）レベルは有意に上昇した。より長い期間ノルデナウ水を飲んだ場合には、改善された患者の割合が増加した（Gadek, Li, & Shirahata, 2006; Gadek, Hamasaki, & Shirahata, 2009）。中国吉林省長春市の第一中央病院で行われたオープン臨床試験において、65例の糖尿病患者と50例の高脂血症患者が2ヵ月間にわたり1日当たり約2リットルの日田天領水を飲んだ。その結果、89%の糖尿病患者において血糖値が有意に低下した。さらに、92%の高脂血症患者の血液トリグリセリドと総コレステロール値が有意に低下した（Osada *et al.*, 2010）。また、29例の2型糖尿病患者の二重盲検無作為臨床試験が福岡市にある福岡徳洲会病院で実施された。1日当たり1リットルの日田天領水を6ヵ月間飲用した患者の尿中8-OH dG（体内の酸化マーカー）レベルが有意に低下した（Matsubayashi, Hisamoto, Muraio, & Hara,

2008)。さらに、2008年11月から2009年9月まで広島大学で行われた100人の被験者に対する無作為二重盲検臨床試験では、日田天領水を1日当たり2リットル飲用すると、空腹時血糖、血圧、総コレステロール、LDLコレステロール、GOT・GPT・ γ -GTP、トリグリセリド値、動脈硬化指標、尿酸値、およびレプチン値などの値における有意な低下が認められ、抗メタボリックシンドローム効果や便秘の改善効果が確認された(Higashikawa, Kuriya, Noda, & Sugiyama, 2009)。臨床試験では、1日当たり2リットルの天然ミネラル水を飲むこと自体も健康に有益であることが示唆された。

還元水のその他の生理的機能

線虫の寿命延長効果

老化に関する最近の理論において、生物の体内において生存期間を延長するための最適な活性酸素レベルが存在し、不十分なあるいは過剰なレベルの活性酸素はともに生存期間を短縮するという説が提唱されている(Brewer, 2009)。我々は電解還元水が活性酸素を除去することにより線虫(*Caenorhabditis elegans*)の生存期間を有意に延長することを報告した(Yan *et al.*, 2010)。電解還元水中の線虫の生存期間延長を起こす活性物質は、水素分子ではなく、ppb(10億分の一率)レベルの白金ナノ粒子であることが示唆されている(Yan *et al.*, 2011)。最適濃度の白金ナノ粒子が活性酸素を除去することによって線虫の生存期間を延長することが他のグループによっても報告されている(Kim *et al.*, 2008; Kim, Shirasawa, & Miyamoto, 2010)。

抗腫瘍効果

ガン細胞では不死化遺伝子の一つであるテ

ロメラゼ酵素が強く発現しているため、染色体末端に存在するテロメアが短縮せず、老化を起こさない。電解還元水を添加した培地中でガン細胞中を培養すると、テロメアが短縮し、細胞の増殖が抑制された(Shirahata *et al.*, 1999)。また、悪性のガン細胞は血管内皮細胞増殖因子VEGFを分泌することにより活発に血管を新生して増殖する。電解還元水は細胞内活性酸素を除去して、血管内皮成長因子の遺伝子発現と分泌を抑制することによって腫瘍性血管新生を抑制した(Ye *et al.*, 2008)。電解還元水はガン細胞と微生物の増殖を抑制した(Hamasaki *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2001)。さらに、グルタチオン共存下でヒト白血病HL60細胞のアポトーシスを誘発した(Tsai, Hsu, Chen, Ho, & Lu, 2009)。電解還元水はK562白血病細胞の巨核細胞(正常細胞)への分化を誘導することにより抗腫瘍効果を示した(Komatsu *et al.*, 2003)。白金ナノ粒子を添加した電解還元水は発ガン物質3-メチルコラントレンとホルボールエステルによるNIT3T3細胞の形質転換(ガン化)を強力に抑制したことから発ガン予防に効果が期待された(Nishikawa *et al.*, 2005)

抗動脈硬化効果

電解還元水はヒトLDLのCu²⁺イオン触媒による酸化を抑制し、高脂肪食品を与えたマウスにおいて、血中中性脂肪濃度を抑制したことから抗高脂血症効果が期待された(Abe *et al.*, 2010)。水素分子を添加した水が動脈硬化を抑制することも報告されている(補足情報を参照)。

抗神経変性症効果

電解還元水は酸化ストレスによる神経細胞死を抑制した(Kashiwagi *et al.*, 2005)。水素

分子添加水も様々な抗神経変性疾患効果を示す（補足情報を参照）。

電解還元水の血液透析への応用

近年、電解還元水を用いた新しい透析方法を確立するために、血液透析への電解還元水の応用が精力的に研究されている（Huang, Yang, Lee, & Chien, 2003; Huang *et al.*, 2006, 2010; Nakayama *et al.*, 2007, 2009, 2010; Zhu *et al.*, 2011）。電解還元水を用いる電解水透析法による治療では、透析に伴う種々の副作用が軽減されることが臨床的に示されている。

抗癌剤の副作用に対する抑制効果

水素添加水は抗癌剤の副作用を抑制する（補足情報を参照）。

水のアクアポリン透過性の増強効果

最近、日田天領水中に含まれる有機溶剤で抽出可能で、かつ凍結不安定な特殊成分が細胞への水透過性を調節するアクアポリン（水チャンネル）活性を増強して、細胞内部への水の透過速度を促進することを報告された（Kitagawa, Liu, and Ding *et al.*, 2011）。アクアポリンを介して水の移動を促進するような成分は細胞の免疫応答を活性化することで、幾つかの慢性疾患の予防または治療を可能にすることが示唆されている。

その他の様々な効果

Naito *et al.* (2002) は、電解アルカリ水の長期投与がラットにおいてアスピリンによって誘発された胃粘膜損傷を抑制することを報告した。電解水素水は、突然変異誘発性、遺伝毒性および亜慢性経口毒性に関して安全であることが報告された（Saitoh, Harata,

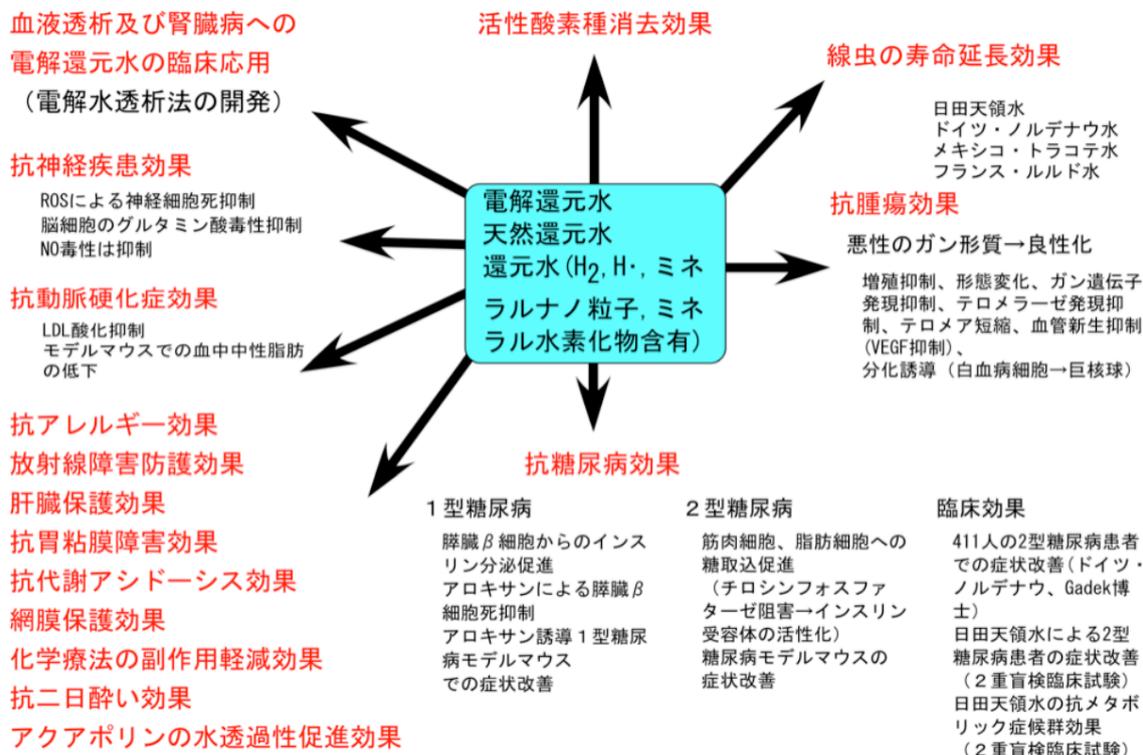


図 4. 還元水の多様な機能

Mizubishi, Nakajima, & Miwa, 2010)。電解還元水は、四塩化炭素によって誘発されたマウスの肝障害に対して保護効果を示した(Tsai *et al.*, 2009)。アルカリイオン水は実験動物において代謝性酸性血症の症状を改善した(Abo-Enein, Gheith, Barakat, Nour, & Sharaf, 2009)。電解還元水は二日酔いに対する抑制効果も示した(Park *et al.*, 2009)。パキスタンのフンザ村で飲まれているフンザ水中に発見された二酸化ケイ素水素化合物は、四塩化炭素によって誘発されたマウス肝臓毒性を抑制した(Tsu *et al.*, 2010)。

近年では、様々な酸化ストレス関連疾患に対して電解還元水の成分の一つである水素分子が抑制効果を示すという論文が多数報告されている(補足情報を参照)。電解還元水や天然還元水だけでなく、水素分子、ミネラルナノ粒子、ミネラル水素物などにより還元力を示す水も還元水の範疇に含まれると考えられる。還元水に関するこれまでの研究から明らかにされた主な機能を図4にまとめた。ただし、この図で示した個々の還元水について示された全ての機能が明らかにされているわけではなく、さらなる研究が期待される。

総括及び展望

蓄積した証拠から、還元水は健康に有益な水であり、糖尿病、ガン、動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー症および血液透析の副作用などの酸化ストレス関連疾患を抑制するということが示唆されている。活性酸素を除去する還元水の作用機序は複雑であると考えられる。電解還元水は水素分子及びミネラルナノ粒子を含んでいる。水素分子は抗酸化酵素の遺伝子発現を誘発できる新しいレドックス制御因子であることが明らかになりつつある。水素分子は金属ナノ粒子の触媒作用によってより強力な

還元性を示す活性水素に変換されて生体内で作用する可能性がある。ミネラルナノ粒子自体も新しいタイプの多機能抗酸化剤である。ミネラル水素化合物ナノ粒子はアスコルビン酸(ビタミンC)のような有機抗酸化物質などと同様な還元物質であり、還元水中の活性物質の候補でもある。天然還元水は上記の活性物質の1つまたは幾つかを含み還元作用を示す可能性がある。電気、磁場あるいは光による水の活性化方法に関する更なる研究は、我々の健康により有益な高エネルギー水の開発に貢献すると考えられる。還元水は羊水と血液を浄化することによって、妊娠女性の健康状態を改善し、胎児の環境汚染に起因する障害を抑制できる可能性がある。

ガン、糖尿病、動脈硬化症、神経変性疾患、アレルギー症などの酸化ストレス関連疾患は多数の病因が絡み合っているために、従来の分子標的医薬では有効に対処できない疾患である。著者らが還元水に関する研究を始めたきっかけは、水道水の代わりに、還元水を日常的に飲むだけで、上記の難治性疾患が改善されるという報告にあった。その後、酸化ストレス関連疾患の原因の一つである活性酸素を、電解水中の水素分子が何らかの機構で活性化されて生成する活性水素が消去することにより生体の恒常性を回復させるという活性水素還元水説を提唱し、さらにミネラルナノ粒子の関与を明らかにして活性水素ミネラルナノ粒子還元水説へと発展させた。還元水は生体内に速やかに取り込まれ、生体のあらゆる細胞を活性化して生体の恒常性の維持・回復に寄与する可能性がある。還元水に関する研究は、現在スウェーデンのカロリンスカ研究所をはじめ、世界各国で真剣な研究が開始されている。従来の抗酸化物質は活性水素を放出して活性酸素を消去した後に、プロオキシダントとして作用し、逆

に酸化ストレスを増大させるという両刃の剣の性質を有している。還元水は主として還元力のみを示す温和な抗酸化物質として今後世界的に普及する可能性が考えられる。

還元水は食品の味、レオロジー、保存性を改善することによって、食品業界にも貢献しうる。産業においては半導体の錆を抑制するための洗浄水としての電解還元水の利用が期待される。環境の分野では、還元水によって還元的雰囲気醸成することにより、腐敗菌や有害菌の増殖を抑制し、川と湖の水の水質改善に効果が期待される。地球創成の頃は水素ガスが豊富に含まれている還元的雰囲気であり、地球で最初に生まれた原始細胞は水素分子を豊富に含んだ還元水中で生まれたと推測されている(Tian et al., 2005)。還元水及び水自体の更なる研究によって、最終的に生命の起源の秘密を明らかにできるものと思われる。

謝辞

還元水研究に関する共同研究において専門的および財政的支援を頂いたことで株式会社日本トリムの森澤紳勝氏および株式会社日田天領水の石井嘉時氏に深く感謝する。電解還元水の抗糖尿病効果に関する我々の研究は日本の科学研究助成金(科研費 No.11876073)によって一部支援された。また、臨床研究にご協力頂いた河村宗典博士(協和病院)と Zbigniew Gadek 博士(ノルデナウ、ドイツ)に深く感謝の意を表す。著者らはまた九州大学大学院農学研究院細胞制御工学分野において、還元水の研究を遂行したすべての研究員及び大学院生に心から感謝する。

Supplementary information(補足資料)

本論文に関連する補足データはオンライン [doi:10.1016/j.tifs.2011.10.009](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.009)で見ることができ

きる。

(本論文は欧文誌論文 (Sanetaka Shirahata, Takeki Hamasaki and Kiichiro Teruya: Advanced research on the health benefit of reduced water. Trends in Food Science & Technology 23 (2012) 124-131) の内容に一部加筆修正を加えて新しくしたものである。改訂2012年3月5日)

文献

- Abe, M., Sato, S., Toh, K., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Teruya, K., et al. (2010). Suppressive effect of ERW on lipid peroxidation and plasma triglyceride level. In M. Kamihira, et al. (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 16 (pp. 315 - 321). Dordrecht: Springer.
- Abo-Enein, H., Gheith, O. A., Barakat, N., Nour, E., & Sharaf, A.-E. (2009). Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 13, 220 - 224.
- Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Uemura, T., & Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* on the surface of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 66, 542 - 548.
- Brewer, G. J. (2009). Epigenetic oxidative redox shift (EORS) theory of aging unifies the free radical and insulin signaling theories. *Experimental Gerontology*, 45, 173 - 179.
- Gadek, Z., & Shirahata, S. (2002). Changes in the relevant test parameters of 101 diabetes patients under the influence of the so-called "Nordenau-phenomenon". In S. Shirahata, et al. (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 12 (pp. 427 - 431). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Gadek, Z., Hamasaki, T., & Shirahata, S. (2009). "Nordenau phenomenon" e application of natural reduced water to therapy. Follow-up study upon 411 diabetes patients. In K. Ikura, et al. (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 15 (pp. 265 - 271). Dordrecht: Springer.
- Gadek, Z., Li, Y., & Shirahata, S. (2006). Influence of natural reduced water on relevant tests parameters and reactive oxygen species concentration in blood of 320 diabetes patients in the prospective observation procedure. In S. Iijima, & K.-I. Nishijima (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 14 (pp. 377 - 385). Dordrecht: Springer.
- Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Aramaki, S., Imada, T., Komatsu, T., Li, Y., et al. (2005). Suppression of cell growth by platinum nanocolloids as scavengers against reactive oxygen species. In F. Godia, & M. Fussenegger (Eds.), *Animal cell technology meets genomics* (pp. 249 - 251). Dordrecht: Springer.
- Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Imada, T., Nakamichi, N., Aramaki, S., Toh, K., et al. (2008). Kinetic analysis of superoxide anion radical scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles. *Langmuir*, 24, 7354 - 7364.
- Hayakawa, T. (1999). Functions and application of alkali-ion suit water. *Food Style*, 21(3), 49 - 55.
- Hayashi, H., & Kawamura, M. (2002). Clinical application of electrolyzed-reduced water. In S. Shirahata, et al. (Eds.),

- Animal cell technology: Basic & applied aspects, Vol. 12 (pp. 31 - 36). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Higashikawa, F., Kuriya, T., Noda, M., & Sugiyama, M. (2009). Verification of improving action of mineral water on lipid metabolism in clinical trials. In Abstract book of the 7th meeting of the Japanese Society of Preventive Medicine (pp. 20).
- Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006). Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell*, 125, 33 - 45.
- Hove, J. R., Koster, R. W., Forouhar, A. S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S. E., & Gharib, M. (2003). Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature*, 421, 172 - 177.
- Huang, H., Fei, Y., Cai, L., Jing, F., Hu, X., Xie, H., Zhang, L., Gong, Z. (2011) Evidence for an oxygen-depleted liquid outer core of the Earth. *Nature*, 479, 513 - 516.
- Huang, K.-C., Hsu, S.-P., Yang, C.-C., Ou-Yang, P., Lee, K.-T., Morisawa, S., et al. (2010). Electrolyzed-reduced water improves T-cell damage in end-stage renal disease patients with chronic hemodialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 25, 2730 - 2737.
- Huang, K.-C., Yang, C.-C., Hsu, S.-P., Lee, K.-T., Liu, H.-W., Morisawa, S., et al. (2006). Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney International*, 70, 391 - 398.
- Huang, K.-C., Yang, C.-C., Lee, K.-T., & Chien, C.-T. (2003). Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney International*, 64, 704 - 714.
- Iwaki, M., Iwane, A. H., Shimokawa, T., Cooke, R., & Yanagida, T. (2009). Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps. *Nature Chemical Biology*, 5, 403 - 405.
- Jin, D., Ryu, S.-H., Kim, H.-W., Yang, E.-J., Lim, S.-J., Ryang, Y.-S., et al. (2006). Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 31 - 37.
- Kajita, M., Hikosaka, K., Iitsuka, M., Kanayama, A., Toshima, N., & Miyamoto, Y. (2007). Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 41, 615 - 626.
- Kashiwagi, T., Hamasaki, T., Kabayama, S., Takaki, M., Teruya, K., Katakura, Y., et al. (2005). Suppression of oxidative stress-induced apoptosis of neuronal cells by electrolyzed reduced water. In F. Godia, & M. Fussenegger (Eds.), *Animal cell technology meets genomics* (pp. 257 - 259). Dordrecht: Springer.
- Kim, M.-J., & Kim, H.-K. (2006). Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. *Life Sciences*, 79, 2288 - 2292.
- Kim, M.-J., Jung, K.-H., Uhm, Y.-K., Leem, K.-H., & Kim, H.-K. (2007). Preservative effect of electrolyzed reduced water on pancreatic b-cell mass in diabetic *db/db* mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 234 - 236.
- Kim, J., Shirasawa, T., & Miyamoto, Y. (2010). The effect of TAT conjugated platinum nanoparticles on lifespan in a nematode *Caenorhabditis elegans* model. *Biomaterials*, 31, 5849 - 5854.
- Kim, J., Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kajita, M., Kanayama, A., et al. (2008). Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Mechanism of Ageing and Development*, 129, 322 - 331.
- Kitagawa, Y., Liu, C., & Ding, X. (2011). The influence of natural mineral water on aquaporin water permeability and human natural killer cell activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409, 40 - 45.
- Komatsu, T., Kabayama, S., Hayashida, A., Nogami, H., Teruya, K., Katakura, Y., et al. (2001). Suppressive effect of electrolyzed reduced water on the growth of cancer cells and microorganisms. In E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou, & L. Elke (Eds.), *Animal cell technology: From target to market* (pp. 220 - 223). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Komatsu, T., Katakura, Y., Teruya, K., Otsubo, K., Morisawa, S., & Shirahata, S. (2003). Electrolyzed reduced water induces differentiation in K-562 human leukemia cells. In K. Yagasaki (Ed.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects* (pp. 387 - 391). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Li, Y.-P., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Kashiwagi, T., Komatsu, T., Ye, J., et al. (2010). Suppressive effects of electrolyzed reduced water on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Cytotechnology*, doi:10.1007/s10616-010-9317-6.
- Li, Y.-P., Hamasaki, T., Teruya, K., Nakamichi, N., Gadek, Z., Kashiwagi, T., et al. (2011). Suppressive effects of natural reduced waters on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Cytotechnology*, in press.
- Li, Y.-P., Nishimura, T., Teruya, K., Maki, T., Komatsu, T., Hamasaki, T., et al. (2002). Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic β -cell damage: scavenging effect against reactive oxygen species. *Cytotechnology*, 40, 139 - 149.
- Li, Y.-P., Teruya, K., Katakura, Y., Kabayama, S., Otsubo, K., Morisawa, S., et al. (2005). Effect of reduced water on the apoptotic cell death triggered by oxidative stress in pancreatic β HIT-T15 cell. In F. Godia, & M. Fussenegger (Eds.), *Animal cell technology meets genomics* (pp. 121 - 124). Dordrecht: Springer.
- Matsubayashi, N., Hisamoto, T., Murao, N., & Hara, T. (2008). About effect of so called reduced water on diabetes patients. In The abstract book of the 46th Kyushu Regional Meeting of Japan Diabetes Society (pp. 82).
- Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Tomatsuri, N., Matsuyama, K., Fujii, T., et al. (2002). Chronic administration with electrolyzed alkaline water inhibits aspirin-induced gastric mucosal injury in rats through the inhibition of tumor necrosis factor- α expression. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 32, 69 - 81.
- Nakayama, M., Kabayama, S., Nakano, H., Zhu, W.-J., Terewaki, H., Nakayama, K., et al. (2009). Biological effects of electrolyzed water in hemodialysis. *Clinical Practice*, 112, c9 - c15.
- Nakayama, M., Kabayama, S., Terawaki, H., Nakayama, K., Kato, K., Sato, T., et al. (2007). Less-oxidative hemodialysis solution rendered by cathode-side application of electrolyzed water. *Hemodialysis International. International Symposium on Home Hemodialysis*. 11, 322 - 327.
- Nakayama, M., Nakano, H., Hamada, H., Itami, N., Nakazawa, R., & Ito, S. (2010). A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: a clinical trial. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 25, 3026 - 3033.

- Nishikawa, R., Teruya, K., Katakura, Y., Osada, K., Hamasaki, T., Kashiwagi, T., et al. (2005). Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation. *Cytotechnology*, 47, 97 - 105.
- Obolenskaya, M. Y., Teplyuk, N. M., Divi, R. L., Poirier, M. C., Filimonova, N. B., Zadrozna, M., et al. (2010). Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions. *Toxicology Letters*, 196, 80 - 86.
- Oda, M., Kusumoto, K., Teruya, K., Hara, T., Maki, S., Kabayama, S., et al. (1999). Electrolyzed and natural reduced water exhibit insulin-like activity on glucose uptake into muscle cells and adipocytes. In A. Bernard, B. Griffiths, W. Noe, & F. Wurm (Eds.), *Animal cell technology: Products from cells, cells as products* (pp. 425 - 427). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., & Ohta, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature Medicine* 13, 688-694.
- Osada, K., Li, Y.-P., Hamasaki, T., Abe, M., Nakamichi, N., Teruya, K., et al. (2010). Anti-diabetes effects of Hita Tenryosui water, a natural reduced water. In K. Ikura, et al. (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 15 (pp. 307 - 313). Dordrecht: Springer.
- Park, S. K., Qi, X. F., Song, S. B., Kim, D. H., Teng, Y. C., Yoon, Y. S., et al. (2009). Electrolyzed-reduced water inhibits acute ethanol-induced hangovers in Sprague-Dawley rats. *Biomedical Research*, 30, 263 - 269.
- Sakamaki, K., Takahashi, E., Nakajima, Y., Nishihara, Y., Funakoshi, K., Suzuki, T., Fukai, Y. (2009) Melting phase relation of FeHx up to 20 Gpa: Implication for the temperature of the Earth's core. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 174, 192 - 201.
- Saitoh, Y., Harata, Y., Mizuhashi, F., Nakajima, M., & Miwa, N. (2010). Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 26, 203 - 216.
- Shirahata, S. (2002). Reduced water for prevention of diseases. In S. Shirahata, et al. (Eds.), *Animal cell technology: Basic & applied aspects*, Vol. 12 (pp. 25 - 30). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Shirahata, S. (2004). Reduced water. In *Characteristics and application technology e Application to the fields of agriculture, foods, and medical therapy* (pp. 33 - 45). Tokyo: N.T.S.
- Shirahata, S., Hamasaki, T., Nakamura, T., Abe, M., Yan, H., Kinjo, T., Nakamichi, N., Kabayama, S., Teruya, K. Anti-diabetes effect of water containing hydrogen molecule and Pt nanoparticles. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 8), 18.
- Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., et al. (1997). Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234, 269-274.
- Shirahata, S., Li, Y., Hamasaki, T., Gadek, Z., Teruya, K., Kabayama, S., et al. (2007). Redox regulation by reduced water as active hydrogen donors and intracellular ROS scavengers for prevention of type 2 diabetes. In E. Smith (Ed.), *Cell technology for cell products* (pp. 99 - 101). Dordrecht: Springer.
- Shirahata, S., Murakami, E., Kusumoto, K.-I., Yamashita, M., Oda, M., Teruya, K., et al. (1999). Telomere shortening in cancer cells by electrolyzed-reduced water. In K. Ikura (Ed.), *Animal cell technology: Challenges for the 21st century* (pp. 355 - 359). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Shirahata, S., Nishimura, T., Kabayama, S., Aki, D., Teruya, K., Otsubo, K., et al. (2001). Anti-oxidative water improves diabetes. In E. Lindner-Olsson, et al. (Eds.), *Animal cell technology: From target to market* (pp. 574 - 577). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Stevens, T. O. and McKinley, J. P. (1995). Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, 270, 450 - 454.
- Tashiro, H., Kitahara, T., Fujiyama, Y., & Banba, T. (2000). Clinical evaluation of alkali-ionized water for chronic diarrhea - placebocontrolled double-blind study. *Digestion & Absorption*, 23, 52 - 56.
- Tian, F., Toon, O.B., Pavlov, A.A., De Sterck, H. (2005). A hydrogen-rich early earth atmosphere. *Science*, 308, 1014 - 1017.
- Tsai, C.-F., Hsu, Y.-W., Chen, W.-K., Chang, W.-H., Yen, C.-C., Ho, Y.-C., et al. (2009). Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2031 - 2036.
- Tsai, C.-F., Hsu, Y.-W., Chen, W.-K., Ho, Y.-C., & Lu, F.-J. (2009). Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells due to electrolyzed-reduced water and glutathione. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 280 - 287.
- Tsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Chuang, W.-C., Chen, W.-K., Ho, Y.-C., & Lu, F. J. (2010). Protective effects of silica hydride against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1644 - 1653.
- Yan, H., Tian, H., Kinjo, T., Hamasaki, T., Tomimatsu, K., Nakamichi, N., et al. (2010). Extension of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by the use of electrolyzed reduced water. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 2011 - 2015.
- Yan, H., Kinjo, T., Tian, H., Hamasaki, T., Teruya, K., Kabayama, S., et al. (2011). Mechanism of the lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* by electrolyzed reduced water - participation of Pt nanoparticles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1295 - 1299.
- Ye, J., Li, Y., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Komatsu, T., Kashiwagi, T., et al. (2008). Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 19 - 26.
- Zhen, J.-M., Pollack, G.H. (2003) Long-range forces extending from polymer-gel surface. *Physical Review*, 68, 031408.
- Zhu, W.-J., Nakayama, M., Mori, T., Nakayama, K., Katoh, J., Murata, Y., et al. (2011). Intake of water with high levels of dissolved hydrogen (H₂) suppresses ischemia-induced cardio-renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26, 2112 - 2118.

Supplementary information (補足情報)

健康に良い還元水研究の進歩

白畑 實隆*, 濱崎武記, 照屋輝一郎

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門、〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

*責任著者：白畑實隆、〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1、電話：+81-92-642-3045；ファクス：
+81-92-642-3052

電子メール：sirahata@grt.kyushu-u.ac.jp

新しい活性酸素種 (ROS) 消去剤としての水素及びミネラルナノ粒子を含んだ還元水の作用機序

ROS 消去剤としての還元水の生理学的機能

活性酸素種 (ROS) は種々の酸化ストレスに関連した病気や老化の原因となることが知られている (Jomova & Valko 2011)。Hayashi (1995) は最初に種々の病気に対する電解還元水(ERW)の改善効果に注目し、水素分子を含んだ電解還元水が、体内で活性酸素を消去することによって種々の病気を改善するという「水制御説」を提唱した。Hayashi and Kawamura (2002) は 1985 年から 2000 年までの間に行った数千例の臨床観察に基づいて、電解還元水が以下のような多くの疾病に対して改善効果を示すことを報告した：糖尿病における血糖値と糖化ヘモグロビン (HbA1c) 値の低下；糖尿病性壊疽における抹消血液循環の改善；痛風における尿酸値の低下；肝臓疾患における肝機能、肝硬変及び肝炎の改善；胃十二指腸潰瘍の改善と再発防止；高コレステロール、高血圧、狭心症及び心筋梗塞の改善；アレルギー症、アトピー性皮膚炎、喘息及びじんましの改善；自己免疫疾患、膠原病、全身性エリテマトーデス、ベーチェト症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎及び川崎病の改善；肝臓の悪性腫瘍、肝癌及び転移性腫瘍の改善。

著者らは塩化ナトリウム溶液の電解により作られる電解還元水を水道水由来の飲用可能な電解還元水の単純なモデル系として用い、電解還元水がインビトロにおいて活性酸素種の消去効果や DNA の酸化障害抑制効果を持つことを最初に証明した (Shirahata et al., 1997)。その後、我々は電解還元水に陽極側溶液で生成する次亜塩素酸が混入するのを避けるために、バッチ型の電気分解装置を用いて NaOH 溶液の電解により作製される電解還元水を好んで使うことにした。韓国グループは同様に塩化アンモニウム溶液の電解により作製された電解還元水が DNA、RNA 及

びタンパク質を酸化障害から保護することを報告した(Lee et al., 2006)。我々は種々の疾病に対して改善効果を持つとされている日本の日田天領水及びドイツのノルデナウ水などの天然還元水 (NRW) が電解還元水と同様に培養細胞内の ROS を消去し抗糖尿病効果を示すことを報告した (Li et al., 2002)。

水素分子を含む電解還元水

水の電気分解の過程で、水素分子は陰極表面で生成し、酸素分子は陽極表面で生成する (図 1A)。白金(Pt) は安全でかつ効率的に水素分子を生成するため、白金でメッキしたチタン電極が多くの市販電解装置に使用されている。図 1B に示すように、陰極の白金板表面で、ヒドロニウムイオン (H_3O^+) が電子と反応し、 H_2O と吸着された H 原子(H_{ad})、($\text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}_{\text{ad}}$ 、フォルマーステップと呼ばれる) が作られる。2つの H_{ad} が白金電極の表面を移動して (H 原子の溢流(overflow))、水素ガス $\text{H}_2(\text{g})$ 、($2\text{H}_{\text{ad}} \rightarrow \text{H}_2(\text{g})$ 、ターフェルステップと呼ばれる) を作る事ができ、あるいは H_{ad} が直接フォルマーステップで生じた H 原子と反応し ($\text{H}_{\text{ad}} + \text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O}$ 、ヘイロフスキーステップと呼ばれる)、 H_2 ガスを作り出す。 H_{ad} の一部は白金板内部に吸蔵され、吸蔵された水素 H_{ab} を含有した白金水素化物を作る。水素原子はサイズが小さいためにほとんどすべての金属に吸着・吸蔵される。最近、電極におけるこれらの活発な反応がコンピュータシミュレーション法によって明確に証明された (Otani et al., 2008)。

水道水あるいは天然ミネラル水を直流 (例えば、100V) で電気分解するとき、大部分の水 (バルク層の水) は抵抗が低いため、大部分の水と白金板表面との間の非常に薄い境界層 (ヘルムホルツ層) にほとんどの電圧がかかり、陰極周辺は高い電場を持った強力な還元的雰囲気を形成する。強い電界の中で、すべての陽子 (水素イオン) とミネラルイオンは加速度的に移動し、高い反応性を示す (Hamann et al., 2007)。作製直後の電解還元水は過飽和状態であり、水素ナノバブルを含んでいるが、水素ナノバブルは解放条件では 3 時間以内に消滅してしまう (Kikuchi et al., 2007)。

ミネラルナノ粒子とミネラル水素化物の電気化学的な作成

飲料水は種々のミネラルイオンを含んでいる。このようなミネラルイオンは陰極表面上で容易にミネラル原子に還元される。還元されたミネラル原子は自己組織化し、ミネラルナノ粒子あるいはミネラルナノクラスターを作る (図 1B)。電気化学的な還元はミネラルナノ粒子あるいはミネラルナノクラスターを作製する一般的な方法である (Watzky and Finke, 1997; Aiken III and Finke, 1999)。白金、金、バナジウムやパラジウムのようなイオン化傾向の低い金属イオンは容易に安定なミネラルナノ粒子を形成し、長い間 (保護剤で保護された金属ナノ粒子では数年間) 水中に安定に分散することができる。形成されたミネラルナノ粒子は次第に酸化され、ミネラルイオンになるが、その間電子を放つことによって弱い還元性を示す。したがって、電気的還元エネルギーはミネラルナノ粒子の形で長期間電解還元水中に保持されることができると考えることができる。金属ナノ粒子は多くの活性化表面原子を含むため、水中の状態を感知することができることで高い触媒活動を示す。

以前に報告したように、1 mM の NaOH 溶液を白金メッキチタン電極を備えたバッチ型 TI-200S 電気分解装置を使って、100V で 2 時間電気分解した (Ye et al., 2008)。図 1C に示すように、電解還元水は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いた解析では 0.19 ppb の白金を含んでいた。10 リットルの電解還元水をロータリーエバポレーターで 1 リットルに濃縮した。濃縮された電解還元水を分子量 10,000 ダルトンの限外ろ過膜で濾過した。非ろ過画分 (> 10,000) は 12.04 ppb の白金を、ろ過画分 (<10,000) は 2.16 ppb の白金を含んでいた。透過電子顕微鏡解析により非ろ過画分は 1 から 10 ナノメートルの大きさの白金ナノ粒子を含んでいることが明らかとなった (図 1D)。白金ナノ粒子は白金メッキチタン電極から溶出したものと考えられた。図 2 に示すように、合成白金ナノ粒子は多面的な抗酸化活性を示す (Hamasaki et al., 2008)。白金ナノ粒子はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) に匹敵するスーパーオキシドラジカル消去活性を示した (白金ナノ粒子の 2 次速度定数 $ks = 5.03 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、SOD の $Ks = 0.7 - 16 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった)。白金ナノ粒子の安定性を考慮すると、白金ナノ粒子の ROS 消去活性の特性は一般的な抗酸化剤のそれより優れていることが示唆された。白金ナノ粒子はまた、グルタチオン ($ks > 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と同様に効率良くヒドロキシルラジカルを消去した。白金ナノ粒子によって触媒された H_2O_2 分解反応の ks 値は約 10^4 であり、カタラーゼのそれより 3 桁低い。白金ナノ粒子は 10^3 のオーダーの ks 値で H_2 分子を H 原子に活性化した。H 供与体として作用する抗酸化物質による還元反応は白金ナノ粒子の存在下で 10^0 オーダーの ks 値で促進される。電子受容体が溶存酸素であるとき、白金ナノ粒子は抗酸化物質の自動酸化を促進する。しかしながら、その ks 値は 10^0 のオーダーであり高くない。総括すると、白金ナノ粒子は多面的な機能を持つ良い抗酸化物質であると考えられる。飲料可能な電解還元水は種々のミネラルナノ粒子を含んでおり、それらが活性酸素種消去剤として作用するだけでなく、 H_2 活性剤及び H 供与体としても機能している可能性がある。

金属ナノ粒子の水素貯蔵源として利用は多くの注目を引いている。水素原子は極めて小さいために、ほとんどすべての金属原子間に入り込み、金属水素化物を形成する。金属ナノ粒子は多くの水素原子を貯蔵することができる。バナジウム水素化物中の水素原子は直接電子顕微鏡で観察された (Findilay et al., 2010)。パラジウムナノ粒子の水素溶解度はパラジウム 1 原子当たり 0.5H であると報告されている (Yamauchi & Kitagawa, 2005)。2.0 ナノメートルの大きさの白金ナノ粒子は 0.1 キロパスカル以下の H_2 環境下では白金 1 原子当たり 0.12 個の H を吸蔵することが観察された (Isobe et al., 2003; Kitagawa & Yamauchi, 2004)。 Ca^{2+} と Mg^{2+} のような高いイオン化傾向を持っているイオンは、還元されて CaH_2 と MgH_2 のようなミネラル水素化物になる。 CaH_2 と MgH_2 は徐々に水に溶け、水素分子を発生させる (Tessier et al., 2004)。複雑な構造のミネラル水素化物も水中で徐々に水素分子を発生させる (Fan et al., 2011)。陰極表面上には多量の水素原子が存在し、また電解還元水中には過飽和の水素分子が存在しているために、電解還元水が種々のミネラル水素化物ナノ粒子を含んでいる可能性がある (図 1B)。

天然還元水はミネラルナノ粒子とミネラル水素化物を含む

健康に有益であると信じられているいくつかの天然ミネラル水が存在している。1985 年に発見

されたフランスのルルド水は種々の病気を治癒する力を持っていると報告されている (Stephens, 1910)。メキシコのトラコテ水は、1991年に発見され、種々の病気の症状を改善すると伝えられているが、この水についての科学的な報告はほとんどなされていない。約 300 メートルの地下から湧き出ているドイツのノルデナウ水は 1992 年に健康に有益な水であることが見いだされた (Gadek and Shirahata, 2002)。ポンプによって地下深くから汲みだされる日本の日田天領水も健康に有益な水あることを 1997 年に我々は見いだした。日田天領水とノルデナウ水が細胞内活性酸素種を消去することが証明された (Li et al., 2002)。我々は細胞内活性酸素種を消去できる天然水を天然還元水 (NRW) と呼ぶことにした。

それでは、なぜ天然還元水は細胞内の活性酸素種を消去することが出来るのだろうか？ 最近の研究により、数メートルの深さの地下と同程度の数の微生物が 5000 メートルの深さの地下にも棲息していることが明らかとなった。これらの微生物は高温状態の岩石のエネルギーによって地下水が還元されて生成する H_2 エネルギーを利用して生きていると考えられている。 H_2 (水素) が CO_2 (二酸化炭素) と反応して、 CH_4 (メタン) と水を産生する (二酸化炭素呼吸)。 CH_4 (メタン) は SO_4 (硫酸) イオンと反応して H_2S (硫化水素) と CO_2 を産生する (硫酸塩呼吸)。 H_2S (硫化水素) は NO_3 (硝酸) イオンと反応して N_2 (窒素ガス) と SO_4 (硫酸) イオンを産生する (硝酸塩呼吸)。このような化学呼吸を使う微生物は岩石栄養生物と呼ばれ、地下が地球最大の生物圏であると考えられている (Martin et al., 2008) (補足の図 1 参照)。地下深くから汲み上げられた天然還元水はそのような地下の水素エネルギーを保持したミネラルを含んでいるかもしれない。Hiraoka et al. (2004) は電解還元水及び日田天領水の抗酸化活性について報告したが、これらの水の活性成分と思われた水素ガスとバナジウムイオンには、ヒトが実際に飲用した後の血中における活性酸素種消去活性を亢進する効果は認められなかったと報告した (Hiraoka et al., 2006)。

Langmür (1927) は、水分子が水素原子の水素分子への再会合を阻止するという観察をもとに、水を含む水素ガスを高温加熱して純粋な水素原子のガスを安定して作り出し、水素原子が水素分子に変換されるときに発熱反応を利用した水素トーチを発明した。これらの業績により彼はノーベル化学賞(1932年)を受賞した。人間の長寿に有益であると信じられているパキスタンのフンザ地方の雪解け水のシリカ水素化物の研究に基づいて、Stephanson et al. (2002) は、高温で水素 (H_2) 分子から生成した水素原子 (H) を用いて、新規のバイオ-カプセル化されたシルセスキオキサン水素化物 (シリカ水素化物と命名) を合成し、そのシリカ水素化物が数週間の間水中で徐々にヒドリドイオン (マイナス水素イオン) を遊離することを示した。彼らはまたそのシリカ水素化物が細胞毒性を示すことなく、活性酸素消去能を持つことを示した (Stephanson et al., 2003; Stephanson and Flanagan, 2003a, b; 2004a; 2004b)。最近、シリカ水素化物が抗酸化酵素の濃度を上昇させることによって肝臓障害を誘発する肝臓毒素である四塩化炭素 (CCl_4) に対して保護効果が示すことが報告されている (Hsu et al., 2010)。

地下水、河川水、水道水及び市販されている様々なミネラル水を含めた天然水は多数のナノ粒子を含んでいる (Wagner et al., 2004; Wigginton et al., 2007; Handy et al., 2008)。原子間力電子顕微鏡と透過電子顕微鏡を用いて飲料水中のナノ粒子 (繊維性の多糖類粒子と球形の有機物質)

が観察された。飲料水（水道水）中の合計粒子数は $7\text{-}10 \times 10^8$ 粒子/ml であると推定されている (Kaegi et al., 2008)。さらに、ある種の天然水は不定形のシリカミネラルをナノ粒子として含んでおり、これに吸着されたマイナス水素イオンによって抗酸化活性を示す (Kimberly et al., 2001)。さらに検討する必要があるが、これまでの蓄積されたデータによると天然還元水は抗酸化活性を付与するミネラルナノ粒子あるいはミネラル水素化物を含むことが示唆されている。

還元水の 酸化還元電位(ORP) と人間の体

我々の宇宙においてエントロピー(乱雑さを示す物理量の一つ)は本質的に次第に増加する性質を持っており、すべての生物は、エネルギーを消費することによって、エントロピーを減少させ、自由エネルギーを得ている。還元状態にある生物はエネルギーに富んでいて、秩序が保たれている。生物は体内を還元状態に保つために種々の抗酸化物質を大量に含んでいる。酸化還元電位は生体の電子供与性あるいは電子受容性の能力を示す。電子の代わりに、水素あるいは酸素原子を同様に還元反応及び酸化反応に使うことが可能である。酸化還元電位の検出には通常白金電極が用いられる。水中の化学物質が白金電極と化学反応を起こし、白金表面を酸化させるか、あるいは還元する。この反応過程で電圧（ミリボルト）が発生する。

アスコルビン酸のようなたいの有機抗酸化物質は水素原子を放出して、低い酸化還元電位の値を示す。しかしながら、酸化還元電位の値は抗酸化物質の自動酸化に伴って次第に上昇する。不安定な有機抗酸化物質は抗酸化物質あるいは酸化促進物質（プロオキシダント）として作用する多数の化学物質を産生し、白金電極表面で非常に複雑な反応を起こさせる。酸化還元電位の値は pH の値に依存する。魚、血漿、羊水、唾液、尿、野菜、果物、畜産物、水産物及び種々の市販飲料の酸化還元電位の値は全て平衡酸化還元電位レベルから見て還元領域に属している (Agustini et al., 2001; Okouchi et al., 2002)。Okouchi et al. (2002) は低い酸化還元電位値を示し、人間の体液に類似した「生体水」という概念を提唱した。水素豊富水は、水素分子が白金電極に電子を供与するために -200 から -800 ミリボルトの極めて低い ORP 値を示す。溶存水素濃度と酸化還元電位との間には直線的な相関があることから、水素分子が電解還元水の負の酸化還元電位値に寄与しているものと考えられる (Shirahata et al., 1997)。水素分子はガス化によって水溶液から容易に失われるため電解還元水の酸化還元電位値は次第に上昇する。

白金電極を用いて酸化還元電位測定装置で測定した時の日田天領水及びノルデナウ水の酸化還元電位値は約 +200 mV(標準水素電極電位への補正なしの数値) であり、水素分子は含んでいない。これらの水からは放射能は検出されないことから、これらの水の健康に対する良い効果は、弱い放射能に起因する放射線ホルミシス効果によるものではないと推定される。我々は酸化還元電位測定装置の感度が低いため、天然還元水に含まれている可能性のある少量の還元性ミネラルナノ粒子の酸化還元電位値への寄与が測定できないものと推測している。したがって、酸化還元電位値は還元水の信頼性できる指標ではないと考えている。

電解還元水のラマンスペクトル

ラマンスペクトルは水の水素結合と水の構造を反映している (Walrafen, 1964)。亜硫酸水素ナ

トリウム溶液とその類似化合物から得られた電解還元水のラマンスペクトルは電気分解前の水とかなり異なっている (Pastukhov and Morozov 2000)。そのスペクトルから、電解還元水の中では、過剰な水酸イオン (OH^-) がより対称的で弱い水素結合 ($\text{O}\cdots\text{H}\cdots\text{O}$) の形成に寄与していると考えられる。このことは、協同効果及び $(\text{H}_2\text{O})_n^-$ 会合体への過剰電子の水和のために、協同効果による正の電子親和性をもつ会合体が過剰な電子を捕捉できるということを意味する。ラマンスペクトルはエネルギーに富んだ水の分析に役立つ可能性が高い。

新しい活性酸素消去剤としての水素分子の作用機構

最近、水素分子 (ガス) がヒドロキシルラジカルとペルオキシナイトラジカルを特異的にかつ直接的に消去できる新しい活性酸素消去剤であることが報告され (Ohsawa et al., 2007)、多数の関連論文が発表されている。例えば、水素ガスは種々の酸化ストレス関連疾患モデル動物の症状を改善する (虚血そして再灌流の脳傷害: Ohsawa et al., 2007; 肝臓障害: Fukuda et al., 2007; 心筋虚血-再灌流傷害: Hayashida et al., 2008; 移植によって引き起こされた腸の移植組織の損傷: Buchholz et al., 2008; 新生児の低酸素虚血: Cai et al., 2008; 脳学習作業: Nagata et al., 2009; パーキンソン病: Fu et al., 2009; 抗ガン剤の副作用: Nakashima-Kamimura et al., 2009; 肝炎: Kajiya et al., 2009; 多菌性微敗血症: Xie et al., 2010; 高血糖増強型出血転換: Chen et al., 2010a; 一酸化炭素中毒: Shen et al., 2010; 外傷性脳傷害: Ji et al., 2010; 神経防護: Domoki et al., 2010; 放射線防護: Qian et al., 2010a; 肺の移植によって引き起こされた虚血 / 再灌流傷害: Kawamura et al., 2010; 心臓虚血 / 再灌流傷害: Nakao et al., 2010a; 放射能によって引き起こされた酸化ストレス: Schoenfeld et al., 2011; 酸化ストレスによって引き起こされた血管新生: Kubota et al., 2011; $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が関与する肺傷害: Huang et al., 2011a; 脊髄虚血-再灌流傷害: Huang et al., 2011b; 肺同種移植: Kawamura et al., 2011)。また、培養細胞においても同様な改善報告がある (肥満細胞の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 抗原を介したシグナル伝達経路: Itoh et al., 2009; 多分化能骨髄間質細胞: Kawasaki et al., 2010; マクロファージ細胞での一酸化窒素産生: Itoh et al., 2011)。一方、水素ガスは中等度及び重度の新生児の低酸素-虚血ラットモデルに対して効果的でなかったという報告もある (Matchett et al., 2009)。同じく水素分子を含む水 (水素水) はモデル動物の種々の酸化ストレス関連疾患症状を改善した (アポリポ蛋白 E ノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化症: Ohsawa et al., 2008; パーキンソン病における神経保護: Fujita et al., 2009; Cai et al., 2009; 酸素毒性に対する肺保護: Zheng et al., 2009; 肺損傷: Mao et al., 2009; 心臓・血管イベント: Suzuki et al., 2009; 心筋損傷: Sun et al., 2009; 白金のナノコロイド添加水素水によるガン細胞の増殖抑制: Saitoh et al., 2009; 神経保護: Cai et al., 2009; 網膜保護: Oharazawa et al., 2010; 慢性移植腎障害: Cardinal et al., 2010; Chenet et al., 2010; 脳の記憶機能: Li et al., 2010; 脊髄損傷: Chen et al., 2010b; 肺炎: Chen et al., 2010c; 肝臓傷害: Liu et al., 2010; ザイモサンによって引き起こされた一般的な炎症: Xie et al., 2010; 肺保護: Zheng et al., 2010; 放射線防護: Qian et al., 2010a; 2010b; 炎症: Zhang et al., 2010; 老化促進マウス; Gu et al., 2010; 腎臓傷害: Shingu et al., 2010; 抗ガン剤の副作用: Kitamura et al., 2010; 肺傷害: Sun et al., 2011a;

一酸化炭素毒性：Sun et al., 2011b； JNK と NF- κ B 活性化の抑制：Wang et al., 2011； 騒音性難聴：Lin et al., 2011； 肺傷害：Fang et al., 2011）。また、ヒトの種々の酸化ストレス関連疾患症状を改善することが報告されている（2型糖尿病：Kajiyama et al., 2008； 腸内細菌による水素産生に対するターメリックの刺激活性効果： Shimouchi et al., 2009； メタボリック症候群： Nakao et al., 2010b）。

まとめると、多数の報告から水素分子がモデル動物において酸化ストレスを軽減することは明白であると考えられる。しかし、培養細胞に及ぼす水素分子の影響についての報告は少ない。Wood & Gradwin (2007) によって指摘されているように、水素分子とヒドロキシラジカルの反応速度定数は非常に小さいため、水素分子が直接的または間接的に細胞や動物において活性酸素を消去するのかどうかを明らかにすることが求められている。Sato et al. (2008) は、水素豊富水が脳断片におけるスーパーオキシド産生を防ぐことを報告した。彼らの結果は、水素分子が直接ヒドロキシラジカルとペルオキシナイトライトを消去し、スーパーオキシド及び過酸化水素は消去しないとす Ohsawa et al. (2007) による最初の報告と一致しない。直接かつ特異的に活性酸素を消去するには血液と組織における水素分子の濃度が低すぎるのではないかという疑問が提起されている。

水素分子は窒素分子を除くと、血液中で酸素及び二酸化炭素について多く存在している。ラットの血液は数 ppb の水素分子を含んでいる (Ohsawa et al., 2007)。水中の水素ガス (分子) の飽和濃度は室温で 1.6 ppm (800 μ M) 程度である。市販されている装置によって作られる電解還元水などの飲用可能な水素豊富水は 0.08 ppm から 1.6 ppm の水素分子を含んでいる。水素飽和水をラットの胃の中に入れたとき、3分後の心臓の血液中には 10ppb (5 μ M) の水素分子 (160倍の減少) が検出された (Nagata et al., 2009)。Fujita et al. (2009) らは、脳の線条体において水素分子を検出することはできなかったにもかかわらず、0.08 ppm (40 μ M) の水素分子を含む水はパーキンソンモデルマウスの症状を改善することができたと報告した。この結果は、水素分子が生体内で 0.5 ppb (0.25 μ M) 以下の非常に低い濃度で効果を示すことを示唆している。

細胞には水素をシグナル伝達物質としたこれまで知られていない情報伝達経路が存在する可能性がある。水素原子と水素分子の間の変換反応を触媒するヒドロゲナーゼを持っている水素細菌は人体の腸と口腔で多量の水素を作り出すことから (Neale, 1988; Urita et al., 2008; Urita et al., 2009)、生物が進化の過程で水素分子をシグナル伝達物質の一つとして使っていることは当然予想される。実際、生体において水素による刺激を伝達する細胞内の何らかの情報経路が存在するのであろうか？ これまでのところ、酸素分子受容体は発見されていない。虚血性心疾患、卒中、腎臓病などの種々のヒトの疾病は低酸素及び酸化ストレスという有害な結果を共通して示す。低酸素誘導因子(HIF)は重要な因子として、低酸素症から細胞を保護する広範囲の遺伝子を活性化する。HIF は、エリスロポエチン、血管内皮細胞成長因子、アドレノメデュリン、マトリックスメタロプロテアーゼ、エンドセリン及び NO 合成酵素を含めて人間の上皮細胞全体の遺伝子のおよそ 2% を制御している (Manalo et al., 2005)。そのレベルは、細胞内酸素センサーであるプロリルヒドロキシラーゼ (PHD) による HIF の分解速度によって制御されている (Miyata et al., 2011)。PHD はジスルフィド結合の比率が細胞の酸化還元状態に依存して変わる酸化還元鋭敏なタン

パク質である。

Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) は多数の抗酸化物質ストレス遺伝子の基礎的な発現と発現誘導を制御している。Nrf2 は多くの抗酸化物質遺伝子を制御している：グルタチオン(GSH)生合成、グルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキシシン還元酵素、チオレドキシシン、ペルオキシレドキシシン、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオン S-転移酵素、UDP-グルクロン トランスフェラーゼ、ヘモオキシゲナーゼ-1、加水分解、鉄輸送、重金属の解毒、輸送、及び 26S プロテアソーム (Jung & Kwak 2010)。Nrf2 活性は酸化ストレスにおける細胞内レドックス感受性タンパクである Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) によって調節されている。Keap1 が Nrf2 に結合して、Nrf2 の核への移行を阻止する。Keap1 は、システインに富むタンパクであり、Keap1 のスルフィドリル残基、特に Cys273 と Cys288 残基が修飾されるとタンパク質の立体構造の変化が起こる。酸化ストレスが Keap1 の立体構造の変化を誘導し、Nrf2 を遊離する。Nrf2 は核へ移行し、抗酸化物質応答領域に結合して上述した多くの抗酸化物質ストレス遺伝子を活性化する。Keap1 はシステインの還元状態の動的変化を通して酸化ストレスと環境ストレスに反応する感受性タンパク質である。

PHD と Keap1 に加え、細胞には NF- κ B や protein tyrosine phosphatase のような多くのレドックス感受性タンパク質がある。これらのタンパク質の機能は分子内ジスルフィド結合の比率に依存した立体構造の変化によって制御されている。ジスルフィド結合形成はおそらくヒトの全タンパク質の~1/3 の生合成に関与している。この非常に重要なプロセスにおいて中心的な役割を果たしているのは protein disulfide isomerase (PDI) である (Fatahet et al., 2009)。レドックス恒常性を統御している細胞メカニズムはおそらく他のストレスと統合的に関係している。小胞体(ER)ストレスは、unfolded protein response と定義される適応シグナルあるいは前アポトーシスシグナルの引き金を引き、幾つかの病態生理学的なプロセスに関与している。タンパク質の折り畳みはレドックスに大きく依存するので、小胞体ストレスと酸化ストレスの関係が興味を引いている (Santos et al., 2009)。小胞体におけるジスルフィド結合の形成は、ER oxidoreduction (Ero1) family の小胞体スルフヒドリルオキシダーゼによって触媒される。Ero1 がタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を酸化し、今度は PDI が ER クライアント タンパク質にジスルフィドを導入する。酸化状態を維持するために、Ero1 が、PDI へのジスルフィド転移と分子状酸素の還元と連結して過酸化水素を生成する。従って、Ero1 活性が小胞体由来酸化ストレスの潜在的な源となる。Ero1 の過剰活性を防ぐように複雑なフィードバック機構が進化した。これらの機構の中核は、調節性ジスルフィドを形成して、局所的な酸化還元状態との関係において Ero1 の触媒活性に影響を与える非触媒性のシステインである (Tavender et al., 2010)。

タンパク質の酸化的折りたたみは、PDI と Ero1 の協調的な作用がチオールグループから最終受容体まで電子を伝達するタンパク質性の電子リレーシステムによって調節されている。好気性の生物においては酸素が最終酸化剤であるように思われる；しかし、例えばフマル酸塩あるいは硝酸塩のような代わりとなる電子受容体の存在は除外できない。興味深いことに、細胞、そして生体における知見から、アスコルビン酸塩、トコフェロール及びビタミンKのような低分子量電子移送体が酸化的折りたたみの機能に貢献できることが示唆されている (Margittai et al.,

2009)。N-アセチルシステインが同じく分子内ジスルフィド結合を分断し、IL-4 シグナルを変化させる (Curbo et al., 2009)。

細胞外環境の酸化的な性質は、細胞内部における非常に還元的な性質とは大きく異なっている。細胞内環境において細胞質ゾル部の酸化還元電位がジスルフィド結合の形成を制限するのに対して、酸化的な細胞外環境はジスルフィド結合に富んだタンパク質を含んでいる。活性酸素種や活性窒素種を排除する細胞外抗酸化剤システムがなかったら、脂質過酸化とタンパク質酸化は過度になり、細胞損傷をもたらすであろう。細胞の酸化ストレスを制限するうえで細胞内と細胞外の両方での抗酸化物質の協調的作用が重要となる (Filomena et al., 2008)。

我々は水素分子の生理学的機能を詳細に検証するために、 $H_2/O_2/CO_2$ の混合ガス環境下で動物細胞の長期培養を可能にする新しいガス培養装置を開発した。我々は水素分子が Nrf2 遺伝子の活性化を介してスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼそしてヘモオキシゲナーゼ 1 のような抗酸化物質酵素の遺伝子発現を誘導することを見出した (Shirahata et al., 2011)。

活性酸素種消去剤あるいはレドックス制御剤としての水素分子の作用機構についてはいくつかの可能性がある。(1) 酸化還元情報を伝達することができる水素分子に対する特定の受容体が存在するのか？(2) 水素分子を、NADH、NAPDH、FAD などと同様、基質として使用するなんらかの酸化還元酵素が存在するのか、(3) 活性水素(水素原子)が生体内で金属ナノ粒子の触媒作用で生産され、情報伝達因子として働くのか？(4) 水素分子が、還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンあるいは他の抗酸化物質の比率の制御を介して、細胞のレドックスバランスを制御するのか、(5) 水素が小胞体内腔での電子リレーと Ero1、DPI、Nrf2 及び Keap1 のようなレドックス感受性タンパク質の立体構造変化を制御することができるのか？

これらのすべての知見に基づいて、我々は還元水の一般的な作用機構を説明する活性水素ミネラナノ粒子還元水説(図4)を提案している(Shirahata et al., 1997; Shirahata, 2002; Shirahata, 2004; Ye et al., 2008)。安全な飲料水を電気分解によって電解還元水に変えることができる。電解還元水は多くの水素分子とミネラルナノ粒子を含み、電気エネルギーによって産生された還元エネルギーを一時的に維持することができる。電解還元水は還元エネルギーを放出した後、本来の安全な飲料水に戻ると推測される。このことが、電解還元水が副作用を示さない理由であるかもしれない。天然還元水は、水素分子、ミネラルナノ粒子あるいはミネラルナノ粒子水素化物のかたちで地下の岩石の還元エネルギーを保持した水ではないかと推測される。水素豊富水と還元ミネラル含有水も還元水の範疇に含まれる。還元活性のみを示す還元水は、抗酸化剤と酸化剤(プロオキシダント)の両方の機能を持つ従来の有機抗酸化剤のパラドックス的効果を克服する抗酸化剤として新しい研究領域を切り開くものと思われる。

文献

- Agustini, T. W., Suzuki, M., Suzuki, T., Hagiwara, T., Okouchi, S., & Takai, R. (2001). The possibility of using oxidation-reduction potential to evaluate fish freshness. *Fisheries Science* 67, 547-549.
- Aiken III, J. D. & Finke, R. G. (1999). A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization,

- and application in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 145, 1-44.
- Buchholz, B. M., Kaczorowski, D. J., Sugimoto, R., Yang, R., Wang, Y., Billiar, T. R., McCurry, K. R., Bauer, A. J., & Nakao, A. (2008). Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *American Journal of Transplantation* 8, 2015-2024.
- Cai, J., Kang, Z., Liu, K., Liu, W., Li, R., Zhang, J. H., Luo, X., & Sun, X. (2009). Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Research* 1256, 129-137.
- Cai, J., Kang, Z., Liu, W. W., Luo, X., Qiang, S., Zhang, J. H., Ohta, S., Sun, X., Xu, W., Tao, H., & Li, R. (2008). Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neuroscience Letters* 441, 167 – 172.
- Cai, J. M., Kang, Z., Liu, K., Liu, W., Li, R., Zhang, J. H., Luo, X., & Sun, X. (2009). Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Research* 1256, 129-137.
- Cardinal, J. S., Zhan, J., Wang, Y., Sugimoto, R., Tsung, A., McCurry, K. R., Billiar, T. R., & Nakao, A. (2010). Oral administration of hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rat renal transplantation. *Kidney International* 77, 101-109.
- Chen, C. H., Anatol, M., Zhan, Y., Liu, W. W., Ostrowki, R. P., Tang, J., Zhang, J. H. (2010). Hydrogen gas reduced acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a focal ischemia rat model. *Neuroscience* 169, 402-414.
- Chen, C. W., Chen, Q. B., Mao, Y. F., Xu, S. M., Xia, C. Y., Shi, X. Y., Zhang, J. H., Yuan, H. B., & Sun, X. J. (2010b). Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats. *Neurochemical Research* 35, 1111- 1118.
- Chen, H., Sun, Y. P., Li, Y., Liu, W. W., Xiang, H. G., Fan, L. Y., Sun, Q., Sun, X. J., Wang, Q. (2010c) Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 308-313.
- Curbo, S., Gaudin, R., Carlsten, M., & Marlmberg, K. -J., Troye-Blomberg, M., Ahlborg, N., Karlsson, A., Johansson, M., & Lundberg, M. (2009). Regulation of interleukin-4 signaling by extracellular reduction of intramolecular disulfides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390, 1272-1277.
- Domoki, F., Oláh, O., Zimmermann, A., Németh, I., Toth-Szűki, V., Hugyecz, M., Temesvári, P., Bari, F. (2010). Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. *Pediatric Research* 68, 387-392.
- Fan, M. Q., Sun, L. X., & Xu, F. (2011a). Hydrogen production for micro-fuel-cell from activated Al₂S₃/Zn (X: hydride or halide) mixture in water. *Renewable Energy* 36, 519-524.
- Fang, Y., Fu, X. -J., Gu, C., Xu, P., Wang, Y., Yu, W. -R., Sun, Q., Sun, X. -J., & Yao, M. (2011b). Hydrogen-rich saline protects against acute lung injury induced by extensive burn in rat model. *Journal of burn care & research* 32, e82-91.
- Filomena, G., Ottaviano, B. S., Diane, E. H., & Joseph, L. (2008). Redox regulation in the extracellular environment. *Circulation Journal* 72, 1-16.
- Findlay, S. D., Saito, T., Shibata, N., Sato, Y., Matsuda, J., Asano, K., Akiba, E. Hirayama, T., & Ikuhara Y. (2010). Direct imaging of hydrogen within a crystalline environment. *Applied Physics Express* 3, 116603.
- Fu, Y., Ito, M., Fujita, Y., Ito, M., Ichihara, M., Masuda, A., Suzuki, Y., Maesawa, S., Kajita, Y., Hirayama, M., Ohsawa, I., Ohta, S., & Ohno, K. (2009). Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 453, 81-85.
- Fujita, K., Seike, T., Yutsudo, N., Ohno, M., Yamada, H., Yamaguchi, H., Sakumi, K., Yamakawa, Y., Kido, M., Takaki, A., Katafuchi, T., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., & Noda, M. (2009). Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS ONE* 4, e7247.
- Kyota Fujita¹, Toshihiro Seike¹, Noriko Yutsudo², Mizuki Ohno², Hidetaka Yamada², Hiroo Yamaguchi², Kunihiro Sakumi², Yukiko Yamakawa¹, Mizuho A. Kido³, Atsushi Takaki⁴, Toshihiko Katafuchi⁴, Yoshinori Tanaka⁵, Yusaku Nakabeppu², Mami Noda¹.*
- Fukuda, K., Asoh, S., Ishikawa, M., Yamamoto, Y., Ohsawa, I., & Ohta, S. (2007). Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 670-674.
- Gadek, Z. & Shirahata, S. (2002). Changes in the relevant test parameters of 101 diabetes patients under the influence of the so-called "Nordenau-phenomenon". S. Shirahata et al. (Eds.) *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol.12 (pp. 427-431), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Gu, Y., Huang, C. S., Inoue, T., Yamashita, T., Ishida, T., Kang, K. M., Nakao, A. (2010). Drinking hydrogen water ameliorated cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 46, 269-276.
- Hamann, C. H., Hamnett, A., & Vielstich, W. (2007). *Electrochemistry*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA.
- Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Imada, T., Nakamichi, N., Aramaki, S., Toh, K., Morisawa, S., Shimakoshi, H., Hisaeda, Y., & Shirahata, S. (2008). Kinetic analysis of superoxide anion radical-scavenging and hydroxyl radical-scavenging activities of platinum nanoparticles. *Langmuir* 24, 7354-7364.
- Handy, R. D., Owen, R. & Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315-325.
- Hatahet, F., Ruddock, L. W., Ahn, ., Benham, A., Craik, D., Ellgaard, L., Ferrari, D., & Ventura, S. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants & Redox Signaling* 11,

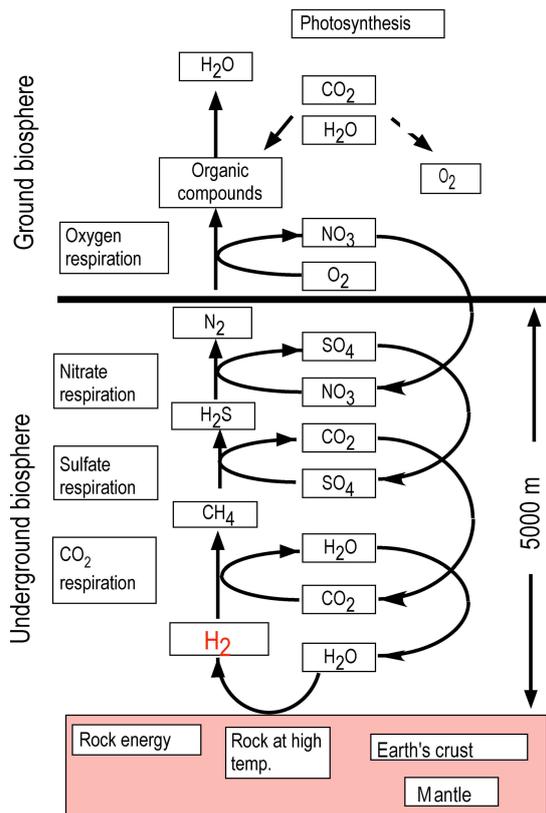
2807-2850.

- Hayashi, H. (1995). Water, the chemistry of life, part IV. *Explore!* 6, 28-31.
- Hayashi, H. & Kawamura, M. (2002). Clinical application of electrolyzed-reduced water. In S. Shirahata et al. (Eds.) *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Volume 12 (pp. 31-36), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Hayashida, K., Sano, M., Ohsawa, I., Shinmura, K., Tamaki, K., Kimura, K., Endo, J., Katayama, T., Kawamura, A., Kohsaka, S., Makino, S., Ohta, S., Ogawa, S., Fukuda, K. (2008). Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373, 30-35.
- Heinekey, M. (2009). Hydrogenase enzymes: Recent structural studies and active site models. *Journal of Organometallic Chemistry* 694, 2671-2680.
- Hiraoka, A., Inaba, H., Suzuki, E., Kasai, K., Suzuki, H., Shinohara, A., Shirao, M., Kubo, K., Yoshimura, Y.. In vitro physicochemical properties of neutral aqueous solution systems (water products as drinks) containing hydrogen gas, 2-carboxyethyl germanium sesquioxide, and platinum nanocolloid as additives. *Journal of Health Sciences* 56, 167-174.
- Hiraoka, A., Sasaki, S., Yamada, T., Shinohara, A., & Chiba, M. (2006). Effects of drinking water product with anti-oxidant activities in vitro on the blood levels of biomarker substances for the oxidative stress. *Journal of Health Sciences*, 52, 817-820.
- Hiraoka, A., Takemoto, M., Suzuki, T., Shinohara, A., Chiba, M., Shirao, M., & Yoshimura, Y. (2004). Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of "active hydrogen". *Journal of Health Sciences* 50, 456-465.
- Hsu, Y. W., Tsai, C. F., Chuang, W. C., Chen, W. K., Ho, Y. C., & Lu, F. J. (2010). Protective effects of silica hydride against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1644-1653.
- Huang, C. -S., Kawamura, T., Peng, X., Tochigi, N., Shigemura, N., Billiar, T. R., & Nakao, A. (2011). Hydrogen inhalation reduced epithelial apoptosis in ventilator-induced lung injury via a mechanism involving nuclear factor-kappa B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408, 253-258.
- Huang, Y., Xie, K., Li, J., Xu, N., Gong, G., Wang, G., Yu, Y., Dong, H., & Lize, X. (2011). Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Brain Research*, 1378, 125-136.
- Isobe, Y., Yamauchi, M., Ikeda, R., & Kitagawa, H. (2003). A study on hydrogen adsorption of polymer protected Pt nanoparticles. *Synthetic Metals* 135-136, 757-758.
- Itoh, M., Hamada, N., Terazawa, R., Ohno, K., Ichihara, M., Nozawa, Y., & Ito, M. (2011). Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon γ -induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411, 143-149.
- Itoh, T., Fujita, Y., Ito, M., Masuda, A., Ohno, K., Ichihara, M., Kojima, T., Nozawa, Y., Ito, M. (2009). Molecular hydrogen suppresses Fc ϵ 1-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389, 651-656.
- Ji, X., Liu, W., Xie, K., Liu, W., Qu, Y., Chao, X., Chen, T., Zhou, J., Fei, Z. (2010). Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress. *Brain Research* 1354, 196-205.
- Jomova, K. & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.
- Jung, K. -A. & Kwak, M. -K. (2010). The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15, 7266-7291.
- Kaegi, R., Wagner, T., Hetzer, B., Sinnet, B., Tzvetkov, G., & Boller, M. (2008). Size, number and chemical composition of nanosized particles in drinking water determined by analytical microscopy and LIBD. *Water Research* 42, 2778-2786.
- Kajiya, M., Sato, K., Silva, M. J., Ouhara, K., Do, P. M., Shanmugam, K. T., & Kawai, T. (2009) Hydrogen from intestinal bacteria is protective for Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386, 316-321.
- Kajiyama, S., Hasegawa, G., Asano, M., Hosoda, H., Fukui, M., Nakamura, N., Kitawaki, J., Imai, S., Nakano, K., Ohta, M., Adachi, T., Obayashi, H. & Yoshikawa, T. (2008). Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutrition Research* 28, 137-143.
- Kawasaki, H., Guan, J., & Tamama, K. (2010). Hydrogen gas treatment prolongs replicative lifespan of bone marrow multipotential stromal cells in vitro while preserving differentiation and paracrine potentials. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 608-613.
- Kawamura, T., Huang, C. -S., Tochigi, N., Lee, S., Shigemura, N., Billiar, T. R., Okumura, M., Nakao, A., & Yoshiya, T. (2010). Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 90, 1344-1351.
- Kawamura, T., Huang, C. -S., Peng, X., Masutani, K., Shigemura, N., Billiar, T. R., Okumura, M., Toyoda, Y., Nakao, A. The effect of donor treatment with hydrogen on lung allograft function in rats. *Surgery* 150, 240-249.
- Kikkawa, Y. S., Nakagawa, T., Horie, R. T., & Ito, J. (2009). Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals. *Neuroreport* 20, 689-694.
- Kimberly, L., Lloyd, P., Wasmund, W., Smith, L. & Raven, P. B. (2001). Clinical effects of a dietary antioxidant silicate supplement, microhydrin, on cardiovascular responses to exercise. *Journal of Medical Food* 4, 151-159.

- Kitagawa, H. & Yamauchi, H. (2004). Hydrogen storage in metal nanoparticles. *Kagaku Kogyo* 55, 954-959.
- Kitamura, A., Kobayashi, S., Matsushita, T., Fujinawa, H., & Murase, K. (2010). Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *British Journal of Radiology* 83, 509-514.
- Kikuchi, K., Nagata, S., Tanaka, Y., Saihara, Y., & Ogumi, Z. (2007). Characteristics of hydrogen nanobubbles in solutions obtained with water electrolysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 600, 303-310.
- Kubota, M., Shimmura, S., Kubota, S., Miyashita, H., Kato, N., Noda, K., Ozawa, Y., Usui, T., Ishida, S., Umezawa, K. et al. (2011). Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52, 427-433.
- Langmür, I. (1927). Flames of atomic hydrogen. *Industrial and Engineering Chemistry* 19, 667-674.
- Lee, M. -Y., Kim, Y. -K., Ryoo, K. -K., Lee, Y. -B., & Park, E. -J. (2006). Electrolyzed reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 135, 133-144.
- Li, J., Wang, C., Zhang, J. H., Cai, J. M., Cao, Y. P., Sun, X. J. (2010). Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Research* 1328, 152-161.
- Li, Y. -P., Nishimura, T., Teruya, K., Maki, T., Komatsu, T., Hamasaki, T., Kashiwagi, T., Kabayama, S., Shim, S. -Y., Katakura, Y., Osada, K., Kawahara, T., Otsubo, K., Morisawa, S., Ishii, Y., Gadek, Z., & Shirahata, S. (2002). Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic β -cell damage: Scavenging effect against reactive oxygen species. *Cytotechnology* 40, 139-149.
- Lin, Y., Kashio, A., Sakamoto, T., Suzukawa, K., Kakigi, A., & Yamasoba, T. (2011). Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Neuroscience Letters* 487, 12-16.
- Liu, Q., Shen, W. F., Sun, H. Y., Fan, D. F., Nakao, A., Cai, J. M., Yan, G., Zhou, W. P., Shen, R. X. Yang, J. M., Sun, X. J. (2010). Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice. *Liver International* 30, 958-968.
- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L. Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G., & Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659-669.
- Mao, Y. F., Zheng, X. F., Cai, J. M., You, X. M., Deng, X. M., Zhang, J. H., Jiang, L., & Sun, X. J. (2009). Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 602-605.
- Margittai, E., Csala, M., Mandl, J., & Banhegyi, G. (2009). Participation of low molecular weight electron carriers in oxidative protein folding. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 1346-1359.
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., & Russell, M. J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology* 6, 805-814.
- Matchett, G. A., Fathali, N., Hasegawa, Y., Jadhav, V., Ostrowski, R. P., Martin, R. D., Dorotta, I. R., Sun, X., & Zhang, J. H. (2009). Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia-ischemia rat models. *Brain Research* 1259, 90-97.
- Miyata, T., Takizawa, S., van Ypersele, de Strihou, C. (2011). Hypoxia: 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *American Journal of Physiology* 300, C226-C231.
- Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., & Ohta, S. (2009). Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 501-508.
- Nakao, A., Kaczorowski, D. J., Wang, Y., Cardinal, J. S., Buchholz, B. M., Sugimoto, R., Tobita, K., Lee, S., Toyoda, Y., Billiar, T. R., & McCurry, K. R. (2010a). Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 29, 544-553.
- Nakao, A., Toyoda, Y., Sharma, P., Evans, M., & Guthrie, N. (2010b). Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome--- An open label pilot study. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 46, 140-149.
- Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S., & Ohta, S. (2009). Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64, 753-761.
- Neale, R. J. (1988). Dietary fibre and health: The role of hydrogen production. *Medical Hypothesis* 27, 85-87.
- Newton Editorial (2001). *Another world spreading underground*. *Newton* 21, 92-99.
- Okouchi, S., Suzuki, M., Sugano, K., Kagamimori, S., & Ikeda, S. (2002). Water desirable for human body in terms of oxidation-reduction potential (ORP) to pH relationship. *Journal of Food Science* 67, 1594-1598.
- Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., Takahashi, H., Ohta, S., & Ohsawa, I. (2010). Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, 487-492.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., & Ohta, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature Medicine* 13, 688-694.

- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yamagata, K., Ishikawa, M., & Ohta, S. (2008). Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 1195-1198.
- Otani, M., Hamada, I., Sugino, O., Morikawa, Y., Okamoto, Y., & Ikeshoji, T. (2008). Electrode dynamics from first principles. *Journal of the Physical Society of Japan* 77, 024802-1-024802-6.
- Pastukhov, V. I. & Morozov, V. P. (2000). Raman scattering of light by the electroactivated water. *Optics and Spectrometry* 88, 35-37.
- Qian, L., Cao, F., Cui, J., Huang, Y., Zhou, X., Liu, S., & Cai, J. (2010a). Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free Radical Research* 44, 275-282.
- Qian, L. R., Li, B. L., Cao, F., Huang, Y. C., Liu, S. L., Cai, J. M., & Gao, F. (2010b). Hydrogen-rich PBS protects cultured human cells from ionizing radiation-induced cellular damage. *Technological Radiation Protection* 25, 23-29.
- Saitoh, Y., Yoshimura, Y., Nakano, K., Miwa, N. (2009). Platinum nanocolloid- supplemented hydrogen dissolved water inhibits growth of human tongue carcinoma cells preferentially over normal cells. *Experimental Oncology* 31, 156-162.
- Sato, Y., Kajiyama, S., Amano, A., Kondo, Y., Sasaki, T., Handa, S., Takahashi, R., Fukui, M., Hasegawa, G., Nakamura, N., Fujinawa, H., Mori, T., Ohta, M., Obayashi, H., Maruyama, N., & Ishigami, A. (2008). Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375, 346-350.
- Santos, C. X. C., Tanaka, L. Y., Wosniak, J., Jr., & Laurindo, F. R. M. (2009). Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* (2009), 11(10), 2409-2427.
- Schoenfeld, M. P., Ansari, R. R., Zakrajsek, J. F., Billiar, T. R., Toyoda, Y., Wink, D. A., & Nakao, A. (2011). Hydrogen therapy may reduce the risks related to radiation-induced oxidative stress in space flight. *Medical Hypothesis* 76, 117-118.
- Shen, M. H., Cai, J. M., Sun, Q., He, J., Sun, X. J., & Huo, Z. L. (2010). Hydrogen as a novel and effective treatment of acute carbon monoxide poisoning. *Medical Hypotheses* 75, 235-237.
- Shimouchi, A., Nose, K., Takaoka, M., Hayashi, H., Kondo, T. (2009). Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. *Digestive Diseases and Sciences* 54, 1725-1729. *Digestive Diseases and Sciences*
- Shingu, C., Koga, H., Hagiwara, S., Matsumoto, S., Goto, K., Yokoi, I., Noguchi, T. (2010). Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth.* 24, 569-574.
- Shirahata, S. & Hamasaki, T., Nakamura, T., Abe, M., Yan, H., Kinjo, T. Nakamichi, N., Kabayama, S., Teruya, K. Anti-diabetes effect of water containing hydrogen molecule and Pt nanoparticles. *BMC Proceedings*, 5(Suppl 8), 18.
- Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., Hayashi, H., Otsubo, K., Morisawa, S., & Katakura, Y. (1997). Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 234, 269-274.
- Shirahata, S. (2002). Reduced water for prevention of diseases. In S. Shirahata et al. (Eds.) *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Vol. 12* (pp.25-30), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Shirahata, S. (2004). Reduced water. In *Characteristics and Application Technology – Application to the fields of agriculture, foods, and medical therapy* (pp.33-45), Tokyo, N.T.S.
- Stephanson, C. J. & Flanagan, P. (2003a) Antioxidant capacity of silica hydride: a combinational photosensitization and fluorescence detection assay. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 1129-1137.
- Stephanson, C. J. & Flanagan, P. (2003b). Synthesis of a novel anionic hydride organosiloxane presenting biochemical properties. *International Journal of Hydrogen Energy* 28, 1243-1250.
- Stephanson, C. J. & Flanagan, P. (2004a). Non-toxic hydride energy source for biochemical and industrial venues: ORP and NAD⁺ reduction analyses. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 459-464.
- Stephanson, C. J. & Flanagan, P. (2004b). Differential metabolic effects on mitochondria by silica hydride using capillary electrophoresis. *Journal of Medicinal Food* 7, 79-83.
- Stephanson, C. J., Stephanson, A. M., & Flanagan, P. (2002). Antioxidant capability and efficacy of mega-HTM silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence Detection. *Journal of Medicinal Food* 5, 10-16.
- Stephanson, C. J., Stephanson, A. M., & Flanagan, P. (2003). Evaluation of hydroxyl radical-scavenging abilities of silica hydride, an antioxidant compound, by a Fe²⁺-EDTA-*i* 2-hydroxyterephthalate fluorometric analysis. *Journal of Medicinal Food* 6, 249-253.
- Stephens, G. A. (1910) Modern miracles of healing. *British Medical Journal* 2, 654-655.
- Sun, Q., Cai, J., Liu, S., Liu, Y., Xu, W., Tao, H., & Sun, X. (2011a). Hydrogen-rich saline provides protection against hyperoxic lung injury. *Journal of Surgical Research* 165, e43-e49.
- Sun, Q., Cai, J., Zhou, J., Tao, H., Zhang, J. H., Zhang, W., & Sun, X. –J. (2011b). Hydrogen-rich saline reduces delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity. *Critical Medicine* 39, 765-769.
- Sun, Q., Kang, Z. M., Cai, J. M., Liu, W. W., Liu, Y., Zhang, J. H., Denoblec, P. J., Tao, H. Y., & Sun, X. J. (2009). Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Experimental Biology and Medicine* 234, 1212-1219.

- Suzuki, Y., Sano, M., Hayashida, K., Ohsawa, I., Ohta, S., & Fukuda, K. (2009). Are the effects of α -glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Letters* 583, 2157-2159.
- Tavender, T. J. & Bulleid, N. J. (2010). Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & Redox Signaling* 13, 1177-1187.
- Tesier, J. -P., Palau, P., Huot, J., Schulz, R., & Guay, D. (2004). Hydrogen production and crystal structure of ball-milled MgH₂-Ca and MgH₂-CaH₂ mixture. *Journal of Alloys and Compounds* 376, 180-185.
- Urita, Y., Watanabe, T., Maeda, T., Arita, T., Sasaki, Y., Ishii, T., Yamamoto, T., Kugahara, A., Nakayama, A., Nanami, M., Domon, K., Ishihara, S., Kato, H., Hike, K., Hara, N., Watanabe, S., Nakanishi, K., Sugimoto, M., & Miki, K. (2008). Extensive atrophic gastritis increases intraduodenal hydrogen gas. *Gastroenterology Research and Practice* 2008, Article ID 584929, doi:10.1155/2008/584929.
- Urita, Y., Watanabe, T., Maeda, T., Sasaki, Y., Ishihara, S., Hike, K., Sanaka, M., Nakajima, H., & Sugimoto, M. (2009). Breath hydrogen gas concentration linked to intestinal gas distribution and malabsorption in patients with small-bowel pseudo-obstruction. *Biomarker Insights* 4, 9-15.
- Wagner T, Bundschuh T, Schick R, & Köster R (2004). Detection of aquatic colloids in drinking water during its distribution via a water pipeline network. *Water Science and Technology* 50, 27-37.
- Wang, C., Li, J., Liu, Q., Yang, R., Zhang, J. H., Cao, Y. -P., & Sun, X. -J. (2011). Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-kappa B activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 491, 127-132.
- Walrafen, G. E. (1964). Raman spectral studies of water structure. *The Journal of Chemical Physics* 40, 3249-3256.
- Watzky, M. A. & Finke, R. G. (1997). Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth. *Journal of American Chemical Society* 119, 10382-10400.
- Wigginton, N. S., Haus, K. L. & Hochella, Jr., M. F. (2007). Aquatic environmental nanoparticles. *Journal of Environmental and Monitoring* 9,1306-1316.
- Wood, K. C. & Gladwin, M. T. (2007). The hydrogen highway to reperfusion. *Nature Medicine* 13, 673-674.
- Xie, K., Yu, Y., Pei, Y., Hou, L., Chen, S., Xiong, L., Wang, G. (2010). Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock* 34, 90-97.
- Xie, K., Yu, Y., Zhang, Z., Liu, W., Pei, Y., Xiong, L., Hou, L., & Wang, G. (2010). Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation. *Shock* 34, 495-501.
- Yamauchi, M. & Kitagawa, H. (2005). Hydrogen absorption of the polymer-coated Pd nanoparticle. *Synthetic Metals* 153, 353-356.
- Ye, J., Li, Y., Hamasaki, T., Nakamichi, N., Komatsu, T., Kashiwagi, T., Teruya, K., Nishikawa, R., Kawahara, T., Osada, K., Toh, K., Abe, M., Tian, H., Kabayama, S., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura, Y., & Shirahata, S. (2008). Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 19-26.
- Zhang, Y. F., Sun, Q., He, B., Xiao, J., Wang, Z. N., & Sun, X. J. (2010). Anti-inflammatory effect of hydrogen-rich saline in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion. *International Journal of Cardiology* 148, 91-95.
- Zheng, X. F., Mao, Y. F., Cai, J. M., Li, Y. H., Liu, W. W., Sun, P. L., Zhang, J. H., Sun, X. J., & Yuan, H. B. (2009). Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radical Research* 43, 478-484.
- Zheng, J., Liu, K., Kang, Z., Cai, J., Liu, W., Xu, W., Li, R., Tao, H., Zhang, J. H., & Sun, X. (2010). Saturated hydrogen saline protects the lung against oxygen toxicity. *Undersea Hyperbaric Medicine* 37, 185-192.



The biggest underground biosphere

Hydrogen produced by the reaction of rock (mineral) with water is oxidized by various oxidizers such as carbon dioxide, sulfuric acid, nitric acid, iron, manganese for chemical respiration of microorganisms in underground biosphere.

Lithotrophic organisms eating the earth

Land biosphere

Sea biosphere

Underground biosphere

Natural reduced water may contain mineral nanoparticles and mineral hydrides sustaining hydrogen energy underground.

補足の図 1. 地下生物圏における水素の産生。地下の玄武岩のような岩が、帯水層の水を還元して水素分子を作り出す。地下 5,000 メートルまで生息している多くの岩石栄養生物は水素分子を化学呼吸系によってメタン、硫化水素と窒素へ酸化する。ある種の地下水は多くのミネラルナノ粒子とミネラルナノ粒子水素化物を含んでいる可能性がある。はニュートン誌の論文の図を一部修正した (Newton editorial 2001)。